



ANDERSON HENRIQUE VENÂNCIO

**EMULSÕES DE ÓLEOS ESSENCIAIS NO CONTROLE DE
Listeria monocytogenes EM EMBUTIDO COZIDO E CURADO
DE PEIXE**

**LAVRAS-MG
2021**

ANDERSON HENRIQUE VENÂNCIO

**EMULSÕES DE ÓLEOS ESSENCIAIS NO CONTROLE DE *Listeria monocytogenes*
EM EMBUTIDO COZIDO E CURADO DE PEIXE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de Mestre.

Profa. Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli
Orientadora

**LAVRAS-MG
2021**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Venâncio, Anderson Henrique.

Emulsões de óleos essenciais no controle de *Listeria monocytogenes* em embutido cozido e curado de peixe / Anderson Henrique Venâncio. - 2021.

71 p. : il.

Orientador(a): Roberta Hilsdorf Piccoli.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2021.

Bibliografia.

1. Embutidos de peixe. 2. Compostos naturais. 3. Bactérias patogênicas. I. Piccoli, Roberta Hilsdorf. II. Título.

ANDERSON HENRIQUE VENÂNCIO

**EMULSÕES DE ÓLEOS ESSENCIAIS NO CONTROLE DE *Listeria monocytogenes*
EM EMBUTIDO COZIDO E CURADO DE PEIXE**

**ESSENTIAL OIL EMULSIONS FOR THE CONTROL OF *Listeria monocytogenes* IN
COOKED AND CURED FISH SAUSAGE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADO em 2 de agosto de 2021.

Dr. Nélio Ranieli Ferreira de Paula

Dra. Maria Emília de Sousa Gomes

IFRO

UFLA

Roberta Hilsdorf Piccoli

Profa. Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli
Orientadora

**LAVRAS-MG
2021**

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me guiado, dando-me forças para percorrer longos caminhos, em busca do sucesso profissional e pessoal.

À minha mãe Maria Antônia de Lima, pois enfrentamos tantos obstáculos. Eu a amo, mãe. Sempre estarei junto de você.

À orientadora Roberta Hilsdorf Piccoli, pela força, carinho, amizade, sabedoria e dedicação em toda trajetória. Sem você não teria conseguido!

À Maria Emília de Sousa Gomes, pela amizade, conhecimento e carinho. Obrigado por tudo!

Aos amigos do laboratório, aqueles que rimos, ouvimos, tomamos um café e sentimos falta. Obrigado por tudo, Bruna, Mônica, Juliana, Michelle, Juliana Pinelli, Danilo, Sabrina, Monique, Raquel, Jaymes, Fernanda e todos aqueles que fizeram minha trajetória incrível.

Aos amigos da Planta Piloto de Processamento de Pescados Francielly, Diana, Marcelo, Pedro, Roberta e Bruna, meu muito obrigado a todos vocês pela ajuda na condução das análises, pela amizade, carinho e conhecimento.

Aos meus amigos Marco Aurélio, Maria Abdala, Gislaine e Camila. Obrigado por tudo.

À Eliane, técnica do laboratório de Microbiologia de Alimentos, pela dedicação e carinho com todos nós.

Agradeço a todos técnicos do Departamento de Ciência dos Alimentos (DCA) que foram responsáveis pela minha formação, Creusa, Pamela e Tina.

À Universidade Federal de Lavras, especialmente ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

À FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa e ao CNPQ (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo apoio financeiro para realização deste projeto.

Enfim, obrigado meu Deus! Com todos os espinhos no meu caminho, terei garra e força para enfrentar os meus obstáculos!

RESUMO

Listeria monocytogenes é uma bactéria causadora de toxinfecções alimentares que se multiplica em diversos tipos de alimentos, em destaque nos produtos de origem animal como cárneos, aves e peixes. Para garantir a segurança dos consumidores, nos embutidos cárneos são adicionados sais de nitrato/nitrito. Entretanto, esses conservantes não têm ação muito efetiva contra *L. monocytogenes*. Dessa forma, conservantes alternativos que possam ser utilizados em sinergia com os sais de nitrato/nitrito despertam interesse. Os óleos essenciais são promissores para aplicações em alimentos, especialmente em produtos cárneos, dentre eles os elaborados com carne de peixe. Diante do exposto, objetivou-se com este trabalho avaliar a ação inibitória de emulsões de óleos essenciais sobre *L. monocytogenes* inoculadas em embutidos cozidos e curados de peixe, sobre bactérias lácticas contaminantes, bem como sobre as características físico-químicas do produto. O embutido cozido foi elaborado com filé e carne mecanicamente separada (CMS) de tilápia e adicionado de sais de cura. As concentrações mínimas bactericidas (CMB) dos óleos essenciais de alho, orégano, coentro e cravo-da-índia sobre *L. monocytogenes* ATCC 19177 foram determinadas *in vitro*, sendo respectivamente de: 2%; 1%; 1% e 0,5% (v/v). Baseando-se nas CMB obtidas foram gerados, utilizando-se o Delineamento composto Central Rotacional (DCCR), 27 ensaios contendo diferentes misturas dos óleos essenciais. Todas as misturas apresentaram ação bactericida sobre *L. monocytogenes in vitro*. Avaliando-se o possível impacto sensorial de cada ensaio sobre o produto, escolheu-se o ensaio 10 contendo os óleos de orégano, coentro, alho e cravo nas concentrações respectivas de: 0,16; 0,05; 0,14 e 0,03% (v/v). Os embutidos cozidos e curados de peixe foram elaborados contendo a emulsão de óleos essenciais e 75 ppm de nitrito de sódio. Foi elaborado um controle sem a adição de óleos essenciais. Após cozimento, amostras de 25 g foram inoculadas com 10^6 UFC/g de *L. monocytogenes*, embaladas a vácuo e armazenadas a 10°C por 12 dias. As amostras separadas para as análises físico-químicas não foram inoculadas. Foram quantificados *L. monocytogenes* e bactérias lácticas totais e avaliados o pH, a cor, a atividade de água, oxidação lipídica e nitrito residual após 0, 3, 6, 9 e 12 dias de armazenamento. Não houve redução significativa tanto de *L. monocytogenes* quanto de bactérias lácticas em ambos, tratamento e controle. Entretanto, alterações em algumas características físicas e químicas foram observadas. A cor do produto ficou mais clara no tratamento com adição de óleos essenciais, o pH permaneceu mais alto no 9º e 12º dia de estocagem. Não houve inibição da oxidação lipídica. Embora os óleos essenciais apresentem grandes perspectivas para serem utilizados como conservantes na indústria de embutidos de peixes, a combinação de óleos utilizada nesse experimento não foi eficaz. Dessa forma, sugere-se que pesquisas sejam conduzidas utilizando-se não só emulsões, mas nanoemulsões de misturas de óleos para otimizar a ação antimicrobiana dos óleos essenciais, assim como estudar os aspectos sensoriais.

Palavras-chave: Embutidos de peixe. Compostos naturais. Bactérias patogênicas.

ABSTRACT

Listeria monocytogenes is a bacterium that causes food poisoning that multiplies in different types of foods, especially animal products such as meat, poultry and fish. To ensure consumer safety, meat sausages are added with nitrate/nitrite salts. However, these preservatives do not have a very effective action against *L. monocytogenes*. Thus, alternative preservatives that can be used synergistically with nitrate/nitrite salts are of interest. Essential oils are promising for applications in food, especially in meat products, including those made with fish meat. Given the above, this work aimed to evaluate the inhibitory action of essential oil emulsions on *L. monocytogenes* inoculated in cooked and cured fish sausages, on contaminating lactic acid bacteria, as well as on the physicochemical characteristics of the product. The cooked sausage was made with fillet and mechanically separated meat (CMS) of tilapia and added with curing salts. Minimum bactericidal concentrations (MBC) of essential oils of garlic, oregano, coriander and clove on *L. monocytogenes* ATCC 19177 were determined in vitro, being respectively: 2%; 1%; 1% and 0.5% (v/v). Based on the CMB obtained, 27 trials containing different mixtures of essential oils were generated using the Central Rotational Composite Design (DCCR). All mixtures showed bactericidal action on *L. monocytogenes* in vitro. Evaluating the possible sensorial impact of each test on the product, test 10 was chosen, containing the oils of oregano, coriander, garlic and cloves in the respective concentrations of: 0.16; 0.05; 0.14 and 0.03% (v/v). The cooked and cured fish sausages were prepared containing the emulsion of essential oils and 75 ppm of sodium nitrite. A control was developed without the addition of essential oils. After cooking, 25 g samples were inoculated with 10^6 CFU/g of *L. monocytogenes*, vacuum-packed and stored at 10°C for 12 days. Samples separated for physicochemical analysis were not inoculated. *L. monocytogenes* and total lactic acid bacteria were quantified and pH, color, water activity, lipid oxidation and residual nitrite were evaluated after 0, 3, 6, 9, and 12 days of storage. There was no significant reduction in either *L. monocytogenes* or lactic acid bacteria in both treatment and control. However, changes in some physical and chemical characteristics were observed. The color of the product was lighter in the treatment with the addition of essential oils, the pH remained higher on the 9th and 12th days of storage. There was no inhibition of lipid oxidation. Although essential oils have great prospects for use as preservatives in the fish sausage industry, the combination of oils used in this experiment was not effective. Thus, it is suggested that the research be conducted using not only emulsions, but nanoemulsions of oil mixtures to optimize the antimicrobial action of essential oils, as well as to study the sensory aspects.

Keywords: Fish sausages. Natural compounds. Foodborne bacteria.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	REFERENCIAL TEÓRICO	11
2.1	<i>Listeria</i> sp.....	11
2.2	<i>Listeria monocytogenes</i>	11
2.2.1	Características do microrganismo	11
2.2.2	Invasão intracelular.....	12
2.3	Bactérias lácticas na deterioração de alimentos	13
2.4	Nitrito e nitrato	14
2.5	Óleos essenciais	15
2.5.1	Biossíntese de óleos essenciais.....	15
2.5.2	Atividade antimicrobiana de óleos essenciais	17
2.5.3	Atividade antioxidante dos óleos essenciais.....	19
2.6	Plantas aromáticas condimentares e seus óleos essenciais.....	20
2.6.1	Orégano (<i>Origanum vulgares</i>).....	21
2.6.2	Alho (<i>Allium sativum</i>)	21
2.6.3	Cravo (<i>Syzygium aromaticum</i>)	22
2.6.4	Coentro (<i>Coriandrum sativum</i> L).....	22
2.7	Matriz alimentar: Embutido cozido e curado de peixe	23
3	MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1	Obtenção da carne mecanicamente separada (CMS) e do filé de tilápia	24
3.2	Qualidade microbiológica da carne mecanicamente separada (CMS) de peixe	25
3.3	Ativação, manutenção, estocagem e padronização dos inóculos	26
3.4	Óleos essenciais e determinação da concentração mínima bactericida (CMB)	26
3.5	Estudo de sinergismo antimicrobiano entre óleos essenciais.....	27
3.6	Elaboração, preparação de amostras e inoculação da bactéria em embutido cozido e curado de peixe	29
3.7	Contagem de <i>Listeria monocytogenes</i> e bactérias lácticas.....	31
3.8	Caracterização físico-química dos embutidos.....	31
3.8.1	Análises físico-químicas	32
3.8.1.1	Atividade de água	32
3.8.1.2	Determinação do pH.....	32
3.8.2	Análises químicas.....	32
3.8.2.1	Nitrito residual	32
3.8.2.2	Oxidação lipídica (Índice de TBARS).....	32
3.8.3	Análise física.....	33
3.8.3.1	Determinação e avaliação da cor instrumental.....	33
3.9	Cálculo da velocidade de crescimento.....	33
3.10	Análise estatística dos resultados	33
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35

4.1	Qualidade microbiológica da carne mecanicamente separada (CMS) de peixe	35
4.2	Concentração mínima bactericida (CMB) e avaliação das misturas de óleos essenciais	36
4.3	Inibição de <i>Listeria monocytogenes</i> e bactérias lácticas por emulsão de óleos essenciais em embutido cozido e curado de peixe, ao longo de 12 dias, refrigerados a 10°C	37
4.4	Caracterização físico-química: Atividade de água (Aw) e pH.....	41
4.5	Nitrito residual.....	46
4.6	Oxidação lipídica (TBARS) dos embutidos cozidos e curados de peixe	50
4.7	Cor instrumental dos embutidos cozidos e curados de peixe	52
5	CONCLUSÃO.....	57
	REFERÊNCIAS.....	58
	APÊNDICE A – Quadros das Análises de Variância (ANOVA)	69

1 INTRODUÇÃO

A indústria de peixes encontra-se em amplo crescimento, ocasionado pelo aumento no consumo e produção de pescados nos últimos anos. Complementarmente, imensa quantidade de resíduos pode ser produzida e quando não utilizados são, em sua maioria, descartados no meio ambiente, sem tratamento, levando ao aumento da poluição ambiental (PINTO *et al.*, 2017). Uma das alternativas que vêm sendo utilizadas em experimentos, e ganhando destaque, podendo ser inserida na alimentação, é a utilização da carne mecanicamente separada (CMS) de peixe, obtida através dos resíduos das aparas de filetagem (MACHADO *et al.*, 2018). Na área de desenvolvimento de novos produtos, ela pode ser empregada na elaboração de embutidos, que podem ser empregados na indústria, com destaque aos cárneos cozidos curados, elaborados com filé e CMS de peixe.

Assim como o filé, a carne mecanicamente separada (CMS) possui alto teor de nutrientes, é rica em minerais, lipídeos, proteínas de alta digestibilidade, assim como aminoácidos essenciais à saúde do ser humano. A inserção da CMS na alimentação tradicional por meio de novos produtos é muito viável em razão de seu baixo custo, além de agregar valor ao produto e de lhe conferir melhor plasticidade (DA COSTA *et al.*, 2016). Dentre as espécies de peixes produzidas no Brasil e no mundo, destaca-se a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e estima-se que 30 a 40% de seu filé pode ser aproveitado. Seu material residual, a CMS, pode ser utilizado na tecnologia de alimentos, com o objetivo de diminuir as perdas econômicas das indústrias e os impactos ambientais (BACELAR; MURATORI, 2020).

Apesar do imenso crescimento dos embutidos na indústria, estes alimentos podem ser contaminados após o processamento por microrganismos patogênicos, resistentes às condições inóspitas do ambiente, como a bactéria *Listeria monocytogenes*. Ela se apresenta como bastonete Gram-positivo, não formadora de esporos, anaeróbica facultativa, capaz de provocar um ciclo intracelular de infecção grave nos seres humanos (JAY, 2005). Outros microrganismos também podem contaminar estes produtos após seu processamento, como as Bactérias Ácido Lácticas (BAL), deteriorantes, que quando não reduzidas a níveis seguros, causam efeitos indesejáveis nos embutidos como modificação da cor, odor, sabor e textura, devido a sua intensa atividade metabólica nos alimentos.

Na indústria de produtos cárneos os sais de nitrato e nitrito de sódio/potássio são empregados na formulação dos embutidos, reduzindo a oxidação lipídica, assim como inibindo o crescimento de bactérias patogênicas (LAMARINO *et al.*, 2015). O nitrito de sódio (NO₂) e de potássio (NO₃), conhecidos como sais de cura, além de atuarem como antimicrobianos e

antioxidantes, dão ao produto aroma característico, fixa a cor rósea e promove sua cura. Entretanto, sua utilização nos produtos cárneos é capaz de causar toxicidade à saúde dos seres humanos quando consumidos em longo prazo (LEONARDI; AZEVEDO, 2018). Dessa forma, conservantes alternativos têm sido pesquisados, destacando-se os óleos essenciais.

Os óleos essenciais são substâncias naturais, que vêm sendo utilizados em experimentos, com resultados promissores para aplicação na indústria de alimentos, podendo substituir parcial ou totalmente os sais de cura (VIVIAN *et al.*, 2020). Como características físico-químicas, são líquidos à temperatura ambiente, oleosos, voláteis, de origem vegetal, com uma alta complexidade. São denominados também de óleos etéreos e apresentam aromas muito peculiares. Quimicamente são constituídos de uma mistura composta por fenilpropanoides e terpenoides sendo a classe dos terpenos em maiores quantidades, cerca de 90% (SIMÕES *et al.*, 2007).

Diante de todos os contextos apresentados, o trabalho proposto objetivou avaliar a inibição de *L. monocytogenes* e bactérias lácticas, durante armazenamento, em um embutido cozido e curado de peixe, por óleos essenciais, bem como avaliar sua influência sobre algumas características físico-química do produto.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Listeria* sp.

Listeria sp. tem a capacidade de se multiplicar, sobreviver e se adaptar a condições adversas em vários ambientes de manipulação de alimentos, podendo contaminá-los e dessa forma oferecer riscos à saúde do consumidor. Pode estar presente em pisos, diversos tipos de superfícies como polietileno, aço inoxidável, silicone, utensílios como facas, dentre outros utilizados por manipuladores na indústria de embutidos cozidos cárneos (SIQUEIRA *et al.*, 2017).

Bactérias do gênero *Listeria* apresentam-se em forma de bastonetes, são catalase positiva, não têm a capacidade de formar esporos e são anaeróbicas facultativas. As necessidades de nutrientes para crescimento do gênero são parecidas com as bactérias Gram-positivas e as demais espécies também são similares quanto a necessidade de vitaminas do complexo B, bem como a utilização de aminoácidos e açúcares como a glicose (JAY, 2005).

Existem 12 espécies do gênero *Listeria*: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. ivanovii*, *L. grayi*, *L. rocourtiae*, *L. marthii*, *L. denitrificans*, *L. murrayi*, *L. fleischmannii* e *L. weihenstephanensis*. *L. monocytogenes* é a mais patogênica a seres humanos e animais (GERMANO; GERMANO, 2015).

2.2 *Listeria monocytogenes*

2.2.1 Características do microrganismo

Listeria monocytogenes é um patógeno capaz de atingir mulheres grávidas e recém-nascidos, além de ocasionar abortos, meningites, septicemia e morte. *L. monocytogenes* pode provocar surtos na indústria de alimentos devido às falhas no processamento com possibilidade de contaminação (SILVA *et al.*, 2016a).

Listeria monocytogenes é um patógeno intracelular, Gram-positivo, apresenta um composto lipídico no envelope celular semelhante ao lipopolissacarídeo (LPS) encontrado na membrana externa das bactérias Gram-negativas, assim se diferenciando de outras bactérias Gram positivas. A listeriose é uma infecção causada devido ao consumo de alimentos contaminados. A bactéria é largamente distribuída em vários locais, podendo permanecer em vários ambientes (MATEUS *et al.*, 2018).

São bactérias que suportam temperaturas e condições adversas, multiplica em pH entre 4,1 a 9,6, são psicrotróficas, toleram concentrações elevadas de sal ($\geq 10\%$), multiplicam em temperaturas entre 1°C e 45°C e duas espécies são produtoras de hemolisinas *L. monocytogenes* e *L. ivnovii* (BHUNIA, 2008; GERMANO; GERMANO, 2015).

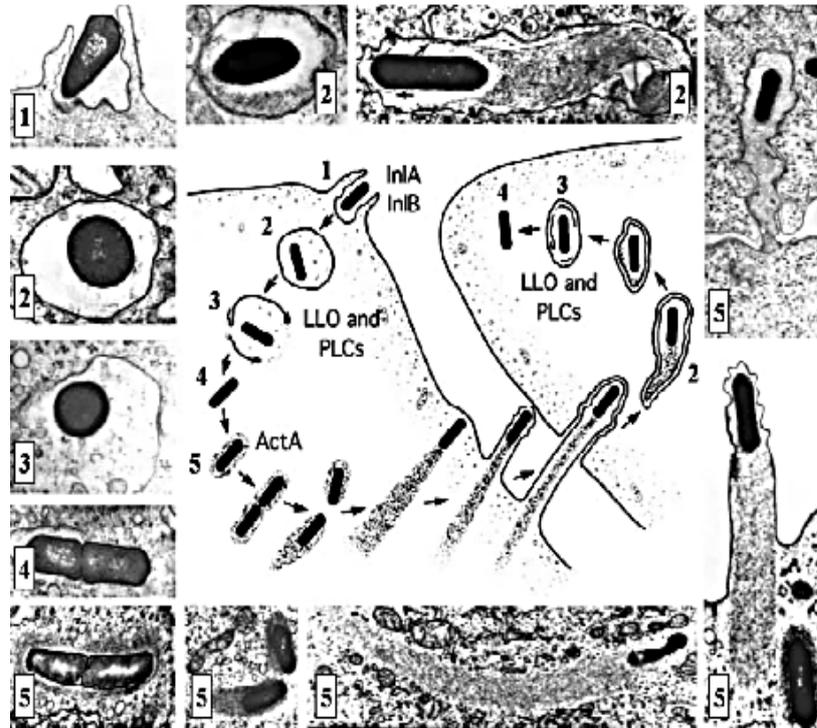
Pode ser encontrada em vários locais distribuídos na natureza como a água, solo, alimentos para animais, como silagens, e no trato gastrointestinal de ruminantes, como bovinos e caprinos. Os produtos de consumo como lácteos, peixes, vegetais, entre outros, se tornam possíveis substratos de contaminação. A bactéria também pode contaminar os alimentos após o seu processamento, gerando grande risco à indústria de alimentos (BHUNIA, 2008).

2.2.2 Invasão intracelular

Listeria monocytogenes contamina os alimentos, sendo a bactéria contraída através da via oral, por meio da qual chega até o intestino para promover a colonização intestinal. Com a sua chegada até o intestino e sua multiplicação, a bactéria entra na corrente sanguínea causando problemas em seres humanos, podendo chegar até a placenta de mulheres que estejam grávidas e acometer o bebê. Como é considerada um patógeno que entra na célula, *L. monocytogenes* busca as células mais suscetíveis nas quais têm a capacidade de penetrar e causar sua multiplicação, como as células de defesa do organismo (JAY, 2005).

Durante seu ciclo, a bactéria sobrevive dentro dos macrófagos, com posterior entrada dentro do citosol, devido a presença da LLO. A proteína actina auxilia na entrada da bactéria dentro do conteúdo celular, formando uma dupla membrana no vacúolo. A LLO com a atuação de enzimas fosfolipases faz com que a bactéria consiga sair e o ciclo se repetir. Com isso, a bactéria se espalha sem sair da célula hospedeira (JAY, 2005). Na Figura 1 está representado o ciclo intracelular de *L. monocytogenes*.

Figura 1 - Eletromicrografias de transmissão dos estágios do ciclo de vida intracelular de *Listeria monocytogenes*.



(1) A penetração no epitélio intestinal ocorre pela atuação de duas proteínas de superfície: internalina A (InlA) e internalina B (InlB). (2) A bactéria é fagocitada por macrófagos do hospedeiro. (3) A lise da membrana fagocítica ocorre pela atuação da listeriolisina O (LLO) e de fosfolipases C (PLCs). (4) A bactéria ganha acesso ao citoplasma celular. (5) O movimento inter e intracelular ocorre pela polimerização de uma cauda de actina no citoplasma do hospedeiro, pela ação da proteína de superfície ActA. A bactéria se dissemina pela corrente sanguínea, ganhando acesso a diferentes órgãos.

Fonte: Adaptado de Martins (2016) e Tilney e Portnoy (1989).

2.3 Bactérias lácticas na deterioração de alimentos

Dentro da indústria de alimentos, os produtos cárneos, quando manipulados inadequadamente e mesmo após seu processamento, podem ser contaminados por diversos microrganismos, incluindo bactérias deterioradoras e patogênicas, assim como os fungos e leveduras. A deterioração dos produtos pode variar de acordo com os fatores intrínsecos e extrínsecos que são capazes de influenciar o crescimento microbiano. Dentre as principais bactérias que modificam os aspectos sensoriais dos alimentos destacam-se: *Pseudomonas*, *Acinetobacter/Moraxella*, *Shewanella putrefaciens*, *Brochotrix thermosphacta* e *Lactobacillus* (ALCÂNTARA *et al.*, 2012).

Muitos microrganismos podem causar a acidificação nos alimentos ou mudanças na sua viscosidade. A acidificação que ocorre nos embutidos cozidos cárneos é devido, principalmente, às bactérias lácticas, como exemplo de gêneros tem-se *Lactobacillus* e

Enterococcus. Muitos microrganismos se multiplicam em embutidos, dentre os quais têm a capacidade de produzir coloração verde, como *Weissella viridescens*, *Leuconostoc*, *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis* que alteram os aspectos sensoriais dos alimentos (JAY, 2005). Estas bactérias que produzem o ácido láctico devido ao consumo de glicose desenvolvem odores e sabores indesejáveis nos alimentos em consequência da sua atividade metabólica.

As bactérias lácticas são oriundas da microbiota do alimento, se multiplicando em ambientes anaeróbicos quando os produtos cárneos são embalados a vácuo e, além disto, são capazes de definir sua vida útil (MEZAROBÁ *et al.*, 2016). Como características, as bactérias lácticas não formam esporos, suportam ambientes ácidos, são fastidiosas e produzem o ácido láctico no alimento devido ao consumo de açúcares. Quando estas bactérias produzem apenas ácido láctico como produto final da fermentação, são chamadas de homofermentativas. Já quando são formados compostos como CO₂, etanol e ácido láctico são denominadas de heterofermentativas (JAY, 2005).

A redução de microrganismos deteriorantes nos alimentos na indústria se torna importante, sua vida útil pode ser prejudicada, podendo causar prejuízos às indústrias (BRAGA, 2018). O uso de métodos adequados de higiene, tratamento térmico e matéria-prima de qualidade garantem uma redução destas bactérias.

2.4 Nitrito e nitrato

O nitrito e nitrato são aditivos que são adicionados aos alimentos com o objetivo de diminuir a oxidação lipídica, manter a cor e desenvolver o sabor de produto curado (FRATUCCI; SILVA; GUEDES, 2017). Entretanto, sua utilização como conservante é de grande importância por inibir a germinação dos esporos de bactérias patogênicas, como *Clostridium botulinum* (LÍRIO; BRITO; ANTUNES, 2017; SARAIVA *et al.*, 2016). Também atua na inibição de outros microrganismos patogênicos como *L. monocytogenes*, dependendo de sua concentração, e de microrganismos deterioradores.

Entretanto, quando esses sais de cura são adicionados aos alimentos, apenas o nitrito tem atividade antimicrobiana. Para que o nitrato tenha atividade, a própria microbiota da carne, em condições anaeróbicas, reduz o nitrato a nitrito. Em condições ácidas e presença de água, o nitrito converte-se em ácido nitroso. Logo depois, ocorre sua conversão em óxido nítrico que reage com os pigmentos da carne, hemoglobina e mioglobina, fixando a cor do produto e formando o aroma característico (FARIA *et al.*, 2001).

Estes conservantes, quando consumidos durante longo prazo, podem apresentar efeitos tóxicos ao organismo, uma vez que podem ser convertidos em nitrosaminas que são reconhecidas como carcinogênicas podendo gerar danos à saúde, assim fazendo-se necessário o uso de conservantes alternativos, que vêm se mostrando promissores com pesquisas em substituição aos utilizados atualmente, como os óleos essenciais.

2.5 Óleos essenciais

As plantas e os microrganismos são seres capazes de produzir grande quantidade de compostos químicos que não se assemelham entre si, apresentando estruturas químicas diferentes umas das outras e que não exercem papel específico durante o metabolismo celular. Estes metabólitos das plantas, também chamados de metabólitos secundários, são capazes de atuar em uma gama de aplicações, com grande relevância para a área terapêutica, antimicrobiana, expectorante, carminativa, antioxidante, farmacológicas, anti-inflamatória, secretolíticas, dentre outras (SIMÕES *et al.*, 2007).

De acordo com a ISO 9235 (*International Standard Organization*, 2013), os óleos essenciais são substâncias obtidas das plantas ou de suas partes por métodos de hidrodestilação ou arraste a vapor, bem como por processo mecânico sem aquecimento com maceração. Cada óleo essencial está depositado em determinada parte da planta. Pode-se obter o óleo essencial de diversas partes das plantas, como folhas, casca, rizomas, raízes, frutos, sementes, flores, caule e cerne (DE SOUZA *et al.*, 2013).

Os óleos essenciais apresentam-se como líquidos em temperatura ambiente, oleosos, voláteis, são bem instáveis em presença de luz, com aroma agradável, complexos, lipofílicos, ligeiramente incolores ou amarelados, exceto o óleo essencial de camomila que tem a coloração azul devido ao alto teor de azuleno. São diferentes de outros tipos de óleos extraídos de semente, que são denominados óleos vegetais. Podem conter constituintes químicos como: aldeídos, cetona, lactonas, peróxido, óxidos, entre outros, até mesmo compostos químicos que podem conter enxofre (SIMÕES *et al.*, 2007).

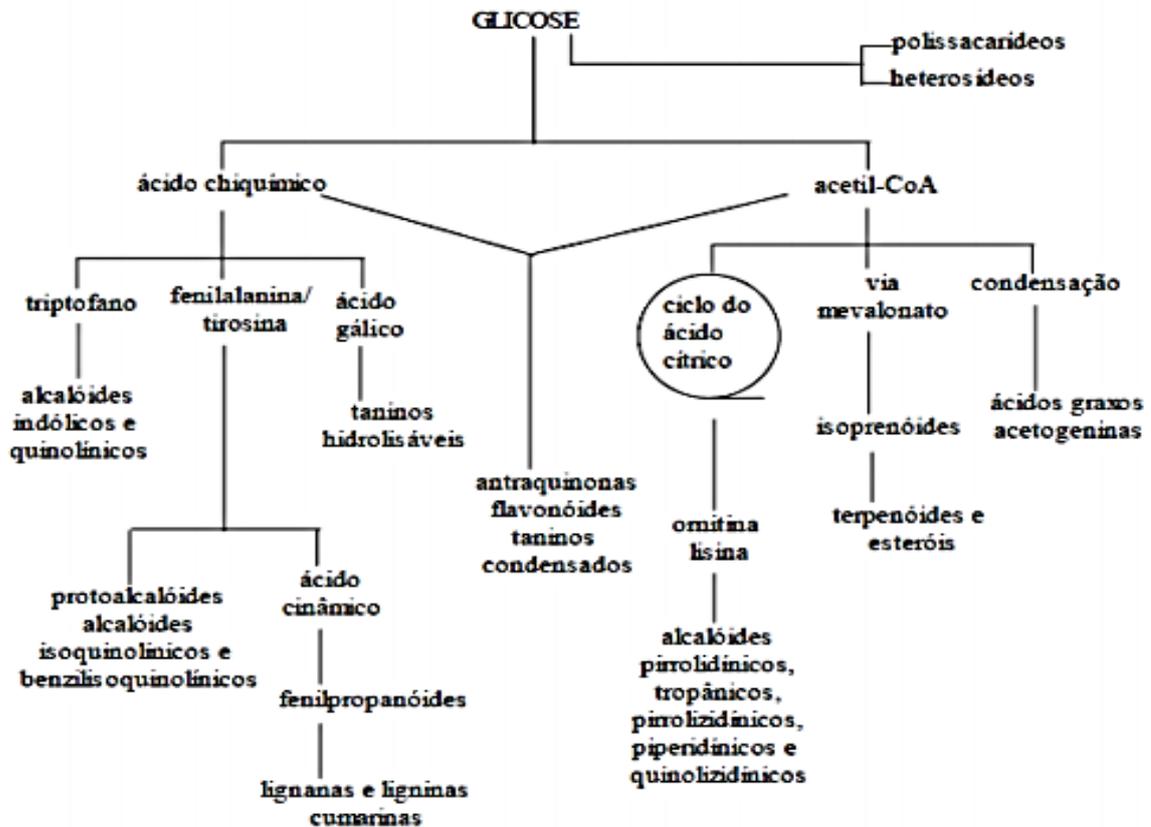
2.5.1 Biossíntese de óleos essenciais

O surgimento de várias substâncias que são produzidas durante o metabolismo secundário, entre elas os óleos essenciais, dá-se através do metabolismo primário, que é o metabolismo comum entre todos os seres vivos, onde são formadas macromoléculas como

carboidratos, proteínas, lipídeos, ácidos nucleicos, entre outras substâncias que asseguram a sobrevivência do indivíduo. Os óleos essenciais se dão através do metabolismo da glicose, envolvendo a via dos principais intermediários, que são o ácido chiquímico e o acetato. O ácido chiquímico, através de várias reações, origina os aminoácidos aromáticos, fenilalanina e tirosina, que são precursores da formação dos fenilpropanoides, um dos componentes dos óleos essenciais. A união da eritrose-4-fosfato, proveniente da via das pentoses, mais o fosfoenolpiruvato produzido na via glicolítica, originará o ácido corísmico, que por meio de reações originará os aminoácidos fenilalanina e tirosina que por atuação da enzima fenilalanina amoliase (PAL) se transformarão em ácido cinâmico e p-cumárico que por meio de reações de redução, oxidação e ciclização, origina os diferentes fenilpropanoides (SIMÕES *et al.*, 2007).

Já pela rota do mevalonato, a condensação aldólica do aceto acetyl coa e acetyl coa origina o ácido mevalônico que é convertido através de reações para originar o isopentenil pirofosfato que, através de uma reação enzimática, origina seu isômero dimetilalil-pirofosfato que por meio da união da cabeça com a cauda originará os monoterpenos, sesquiterpenos e diterpenos que compõem também os óleos essenciais (SIMÕES *et al.*, 2007). Na Figura 2 está representado o ciclo biossintético dos óleos essenciais.

Figura 2 - Ciclo Biossintético de óleos essenciais.



Fonte: Simões *et al.* (2007).

2.5.2 Atividade antimicrobiana de óleos essenciais

Testes *in vitro* são essenciais para determinação da atividade bactericida e podem ser empregados na indústria de alimentos, mas ainda são necessários mais estudos. Ao serem comprovados, podem ser utilizados para controlar microrganismos. São necessárias também pesquisas para análise sensorial, de custos e o emprego de especiarias na fabricação do produto (REIS *et al.*, 2020). Diversos estudos publicados têm relatado a atividade antimicrobiana de óleos essenciais sobre os microrganismos.

Santos (2018), avaliando a concentração mínima bactericida (CMB) de óleos essenciais, observou que houve efeito bactericida de óleos de orégano, tomilho e noz moscada sobre *L. monocytogenes*, verificando o potencial dos óleos para serem utilizados como antibacteriano. A CMB encontrada para cepa foi de 0,1% para ambos, tomilho e orégano, enquanto que para noz-moscada foi de 0,2% comprovando, assim, atividade bacteriana.

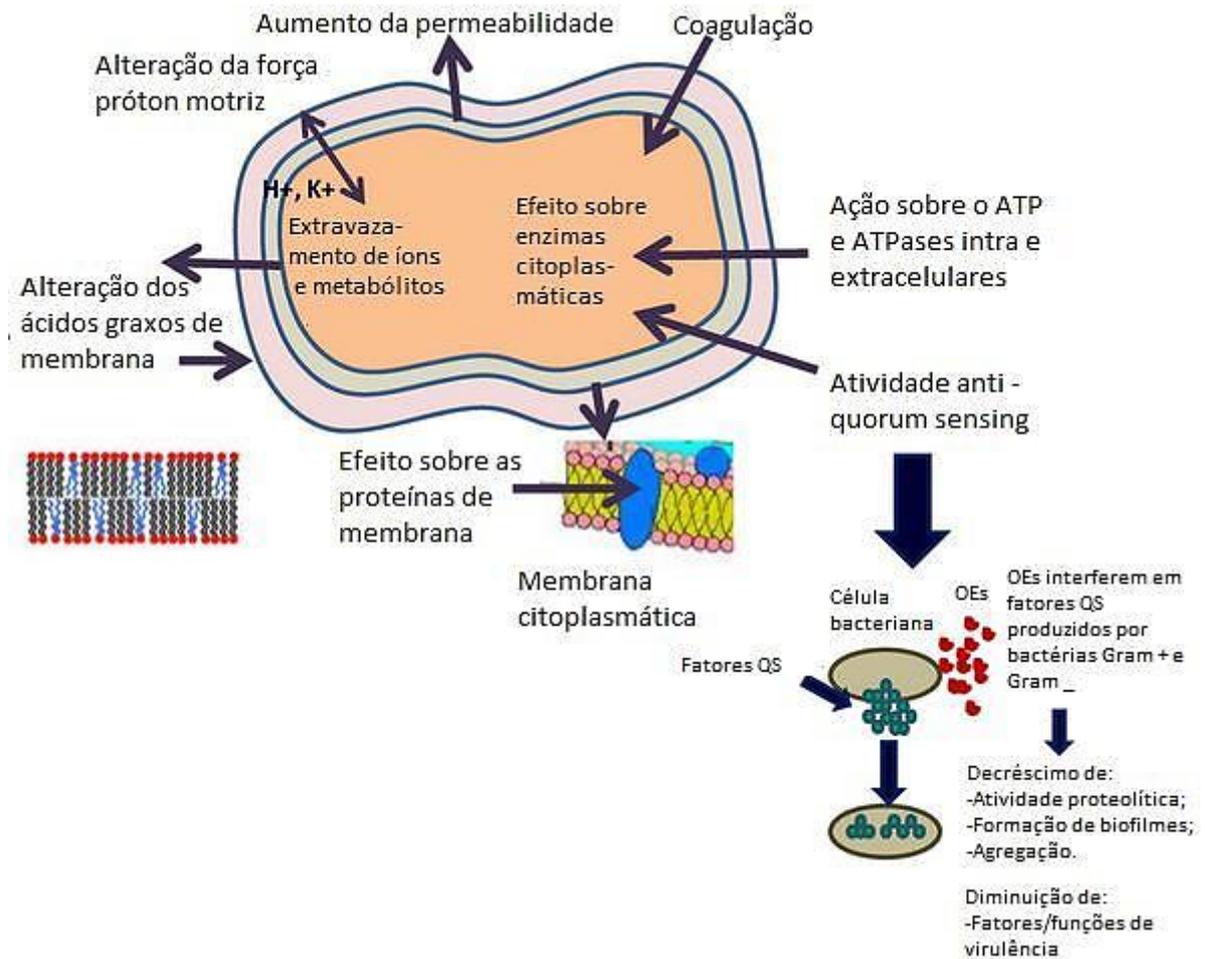
Pesavento *et al.* (2015) observaram a ação dos óleos essenciais de orégano, tomilho e alecrim sobre as bactérias *Staphylococcus aureus* e *L. monocytogenes* inoculadas em almôndegas de carne e armazenadas a 4°C e durante os testes microbiológicos encontraram que

a na concentração de 0,5% os três óleos apresentaram tanto ação bactericida quanto bacteriostática, sendo sugeridos como conservantes naturais em alimentos. Os óleos testados também tiveram boa ação contra cepas de *L. monocytogenes*. Acredita-se que os óleos essenciais que foram testados poderiam ser usados nas indústrias de alimentos durante a preparação de almôndegas de carne e outros produtos semiprontos com vida útil de pelo menos 14 dias em temperatura de armazenamento de 4°C.

O mecanismo de ação dos óleos essenciais ainda não está bem elucidado. Existem vários alvos nas células bacterianas. Um dos mais importantes é a membrana citoplasmática onde os óleos essenciais a permeiam, levando a sua desestruturação e muitas vezes a sua ruptura, causando a perda de sua seletividade, a não produção de energia e o extravasamento do conteúdo citoplasmático (RAO; CHEN; MCCLEMENTS, 2019; TARIQ *et al.*, 2019). Além da atuação sobre a membrana, os óleos essenciais também agem sobre o material genético, DNA ou RNA (BOUYAHYA *et al.*, 2019).

As bactérias Gram-positivas são mais susceptíveis aos óleos essenciais do que as Gram-negativas (POMBO, 2018) uma vez que essas apresentam, além da parede celular, a membrana externa que é composta por lipopolissacarídeo, o que dificulta a entrada do óleo (BURT, 2004). Entretanto, em revisão realizada por Nazzaro *et al.* (2013), vários outros mecanismos de ação são sugeridos (FIGURA 3).

Figura 3 - Mecanismo de ação dos óleos essenciais em células microbianas.



Fonte: Adaptado de Nazzaro *et al.* (2013).

2.5.3 Atividade antioxidante dos óleos essenciais

Vários antioxidantes sintéticos ou naturais são responsáveis por desempenhar a função de inibir a oxidação proteica e lipídica nos alimentos, sendo muito importantes na industrialização dos alimentos. Entretanto, dentre eles existem compostos que são prejudiciais a saúde do consumidor e, portanto, a indústria de alimentos busca maneiras mais eficazes de contornar este problema, como o uso de especiarias ou de óleos essenciais com atividade antioxidante e que são naturais. Estes têm sido uma das melhores opções para substituição de vários antioxidantes atualmente empregados, sendo os óleos essenciais em produtos cárneos, considerado atraente pelos consumidores, não apresentam problemas nutricionais e também podem auxiliar na manutenção da vida útil do produto (LEÃO *et al.*, 2017).

A oxidação lipídica que ocorre nos alimentos, e nos próprios óleos e gorduras, afeta o sabor e gera odores desagradáveis, prejudicando as características sensoriais do produto e seu consumo. Entre os antioxidantes utilizados para prolongar a vida útil estão butil-hidroquinona

terciária (TBHQ) e gelato de propila (PG) (RAMALHO; JORGE, 2006). Destacam-se também o ácido ascórbico, antioxidante natural e utilizado em produtos cárneos, e os sais de cura, nitrito e nitrato que apresentam atividade antioxidante (CARTAXO, 2015). Além destes, os compostos fenólicos, presentes nos vegetais, também são excelentes antioxidantes, só que naturais, e possuem a capacidade de doar hidrogênio e absorver radicais livres (LEÃO *et al.*, 2017).

Os processos oxidativos que ocorrem nos lipídios representam uma das principais causas da redução da vida útil dos produtos alimentícios (CARTAXO, 2015). Existem diferentes formas de inibir os processos oxidativos nos alimentos, dentre eles estudos reportam a utilização de óleos essenciais.

Sharma *et al.* (2017) avaliaram salsichas de frango contendo óleo de cravo da índia (0,25%), óleo de manjeriço (0,125%), óleo de canela (0,25%) e óleo de tomilho (0,125%). As salsichas foram embaladas a vácuo e armazenadas por 45 dias. O controle no experimento apresentou valor maior de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) comparado aos que continham óleos essenciais, sendo que o óleo de cravo promoveu maior inibição da oxidação lipídica. Porém, todos os tratamentos com óleos exibiram melhor atividade antioxidante do que o controle.

Oliveira (2017), avaliando a oxidação lipídica em linguiça frescal de frango adicionada de óleos essenciais, verificou que houve diferença entre os tratamentos, sendo que ocorreu a diminuição da oxidação nas linguiças elaboradas com óleos essenciais de Pimenta da Jamaica (*Pimenta dioica*) e cravo da índia (*caryophyllata*), ressaltando que os óleos são promissores compostos naturais.

Pinelli *et al.* (2021) estudaram os óleos essenciais de limão tahiti (*Citrus aurantifolia*), cardamomo (*Elettaria cardamomum*), pimenta chinesa (*Capsicum chinense*) e quando combinados e aplicados em mortadelas, com concentração reduzida de nitrito (75 ppm), verificaram menores valores ($P < 0,05$) de TBARS para os tratamentos com óleos essenciais (OE), nanoemulsificado ou não, quando comparados ao tratamento controle.

2.6 Plantas aromáticas condimentares e seus óleos essenciais

Muitas plantas aromáticas são produtoras de óleos essenciais. Elas possuem grande destaque na culinária, devido aos seus aromas produzidos e suas propriedades biológicas e nutricionais, as quais podem ser inseridas na alimentação (IZIDORO *et al.*, 2021). Dentre as

plantas que se destacam pelas suas atividades biológicas, como antimicrobiana e antioxidante, que podem ser aplicadas em alimentos, têm-se o orégano, alho, cravo e coentro.

2.6.1 Orégano (*Origanum vulgares*)

O orégano (*Origanum vulgares*), pertencente à família *Lamiacea*, apresenta pequeno porte e diversas atividades biológicas, sendo de uso comum na culinária no mundo todo (ALAGAWANY *et al.*, 2020). É uma planta aromática condimentar originária da região do Mediterrâneo e da Europa Ocidental, que possui diversos benefícios medicinais à saúde (PEZZANI; VITALINI; IRITI, 2017). O orégano apresenta vários compostos, incluindo glicosídeos fenólicos, taninos, resinas, entre outros como o óleo essencial (MORSHEDLOO *et al.*, 2018).

Seu óleo essencial é rico em monoterpenos e tem atividade anti-inflamatória, antimicrobiana e fitoterápica, e suas propriedades biológicas podem ser melhoradas com o uso da nanotecnologia, inclusive sua ação antimicrobiana (PEZZANI; VITALINI; IRITI, 2017). Seus componentes majoritários são o carvacrol e timol (compostos fenólicos), com excelente ação antimicrobiana (GAVARIC *et al.*, 2015).

2.6.2 Alho (*Allium sativum*)

É uma planta herbácea aromática que apresenta diversas propriedades medicinais, atuando em doenças infecciosas (EL-SABER BATIHA *et al.*, 2020a). Há anos o alho é utilizado na alimentação e também no tratamento de vários tipos de doenças. No entanto, cada vez mais está se descobrindo diversas atividades biológicas apresentadas pelo alho e pelos componentes majoritários de seu óleo essencial. Tem propriedades antibacteriana, antifúngica, entre outras, podendo até mesmo contribuir para o sistema imunológico e cardiovascular do organismo humano (HARRIS *et al.*, 2001).

Os compostos químicos encontrados no óleo essencial de alho incluem os sulfuretos orgânicos, como alicina, alina, sulfureto de dialilo, dissulfureto de dialilo, trissulfureto de dialilo, ajoene e S-alil-cisteína, sendo estes os principais bioativos (SHANG *et al.*, 2019).

2.6.3 Cravo – da- índia (*Syzygium aromaticum*)

É considerada uma das especiarias mais antigas, sendo utilizada na conservação de alimentos e também com contribuições benéficas à saúde. O cravo teve sua origem na Indonésia, sendo hoje em dia uma das plantas aromáticas mais cultivadas no Brasil e em outras partes do mundo. Apresenta compostos fenólicos como o eugenol. Suas aplicabilidades incluem a área farmacêutica, agricultura e de alimentos (CORTÉS-ROJAS; DE SOUZA; OLIVEIRA, 2014).

Existem muitos componentes químicos no óleo essencial de cravo, que incluem os sesquiterpenos, monoterpenos e compostos fenólicos. Outros como o acetato de eugenila, eugenol e β -cariofileno são os majoritários do óleo essencial de cravo. Suas atividades biológicas incluem ser expectorante, antimicrobiano, antifúngico e larvicida (BATIHA *et al.*, 2020b).

2.6.4 Coentro (*Coriandrum sativum* L.)

O coentro pertence à família *Apiaceae* e é utilizado na alimentação devido às suas propriedades nutricionais. Seu óleo essencial é antimicrobiano, antioxidante, ansiolítico, analgésico e anti-inflamatório (LARIBI *et al.*, 2015). Pode ser utilizado também na produção de medicamentos. Seus compostos incluem o óleo essencial, os ácidos graxos, carotenoides e esteróis. A composição química e o rendimento do óleo essencial podem ser afetados por fatores como temperatura, tipo e época de plantio, assim como a genética e a variedade utilizada (WEI *et al.*, 2019).

As folhas e sementes da planta são amplamente utilizadas na medicina popular, além de seu uso como tempero no preparo de alimentos (PRACHAYASITTIKUL *et al.*, 2018). O principal componente químico do óleo essencial de coentro é o linalol, e estudos indicam que ele pode ser um ingrediente considerado seguro (MANDAL; MANDAL, 2015). O coentro apresenta também grande variedade de compostos químicos como os polifenóis e outros que possuem excelente atividade antioxidante, reduzindo a oxidação lipídica que ocorre nos alimentos (BARROS *et al.*, 2012).

2.7 Matriz alimentar: Embutido cozido e curado de peixe

O peixe é um excelente alimento com alto teor nutricional de proteínas, aminoácidos essenciais, vitaminas, minerais e lipídeos (SARTORI; AMANCIO, 2012). A tendência da indústria de pescados é o crescimento, e para isto é necessário alinhar o mercado com a produção. Apesar do crescimento, uma imensa quantidade de resíduos provenientes da filetagem de peixes está sendo descartada de forma inadequada e tem se tornando prejudicial ao meio ambiente. Como forma de diminuir este problema é a utilização da carne mecanicamente separada (CMS) obtida dos resíduos das aparas de filetagem de peixes no desenvolvimento de novos produtos (VIEIRA, 2019).

A CMS de pescado é obtida de uma única espécie ou de várias espécies de peixes por procedimento mecânico. A partir dela, se fabrica uma gama de produtos como empanados, embutidos, entre outros, obtendo valor agregado e alto valor nutricional, sendo aceito pelo consumidor (GUIMARÃES; CALIXTO; MESQUITA, 2017). Um desses produtos, que vem sendo alvo de experimentos utilizando a CMS de peixe, são os embutidos cárneos cozidos e curados elaborados com filé e carne mecanicamente separada (CMS) de tilápia, que apresentam alto teor de nutrientes e utiliza a CMS, dando uma destinação a esse resíduo.

Os embutidos cárneos são amplamente consumidos pela população, com tendência ao contínuo crescimento, sendo um de seus atrativos a grande diversificação de produtos tradicionais e os lançamentos frequentes de produtos novos com rotulagens atrativas (MARTINS, 2016). A tecnologia de processamento de embutidos possibilita às populações de baixa renda o acesso às proteínas funcionais oriundas da carne, aumentando as chances de suprimento da recomendação diária de proteína (63 mg/dia).

3 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido nos Departamentos de Ciência dos Alimentos (DCA) e Zootecnia, ambos da Universidade Federal de Lavras (UFLA). A carne mecanicamente separada (CMS) foi obtida na Unidade de Beneficiamento de Peixes, do setor de Piscicultura do Departamento de Zootecnia. Os embutidos e as análises físico-químicas foram realizados na Planta Piloto de Processamento de Pescado e o estudo microbiológico no Laboratório de Microbiologia de Alimentos, ambos localizados no DCA.

3.1 Obtenção da carne mecanicamente separada (CMS) e do filé de tilápia

A matéria-prima utilizada na obtenção da carne mecanicamente separada (CMS) de peixe foi o resíduo das aparas de filetagem de tilápia, doadas pela empresa “Companhia do Peixe” localizada em Lavras-MG. Os resíduos das aparas de filetagem, frescos, acondicionados em gelo, sem a cabeça, pele e vísceras, foram coletados de forma asséptica e acondicionados em caixa isotérmica com gelo e transportados imediatamente até a Usina de Beneficiamento de Peixes do setor de Piscicultura da Faculdade de Zootecnia e Medicina Veterinária da Universidade Federal de Lavras-MG. Logo em seguida, as carcaças foram lavadas com água clorada (5 ppm) e antes da obtenção da CMS elas foram submetidas à mesa serra fita (modelo 1,69, CAF Máquinas, Rio Claro, SP, Brasil) para retiradas de nadadeiras dorsais e caudais. A CMS foi obtida com o uso de despoldadora elétrica (modelo HT 100C, Hightech, Chapecó, SC, Brasil), foi despejada em bandejas de plástico e armazenada dentro de sacos plásticos estéreis de polietileno até a elaboração dos embutidos, como é mostrado na Figura 4. Os filés de tilápia foram adquiridos em estabelecimento comercial localizado na região de Lavras-MG e ambas as matérias-primas foram acondicionadas em freezer (modelo GTPC – 575, Gelopar, Chapada Araucária, PR, Brasil) à -18°C. Durante a obtenção, foram retiradas também amostras da CMS de forma asséptica, para posterior análise microbiológica.

Figura 4 - Obtenção da carne mecanicamente separada (CMS).



Fonte: Do autor (2021).

3.2 Qualidade microbiológica da carne mecanicamente separada (CMS) de peixe

O estudo microbiológico das matérias-primas foi conduzido de acordo com a metodologia de DA SILVA *et al.* (2017). Foram quantificados estafilococos coagulase positiva, microrganismos aeróbios mesófilos totais e enterobactérias. Unidades analíticas de 25 g das amostras de CMS foram retiradas assepticamente e adicionadas a 225 mL de água peptonada a 0,1% (m/v) (HIMEDIA). As amostras foram homogeneizadas em homogeneizador tipo Stomacher (390 golpes/min.) por 2 min.

A contagem de estafilococos coagulase positiva foi realizada empregando-se Ágar Vogel Jhonson (Himedia, Índia), suplementado com 1% de telurito de potássio (Merch, Brasil) e as colônias típicas foram submetidas aos testes bioquímicos de produção de catalase (Probac, Brasil), coagulase (Laborclin, Brasil) e capacidade do microrganismo de utilizar o manitol (Himedia, Índia), assim como o teste da DNASE (Dlabor, Brasil).

Para quantificação dos microrganismos aeróbios mesófilos foi utilizado Ágar Triptona de Soja (Himedia, Índia), utilizando o método de profundidade (*pour plate*). Para a contagem de enterobactérias foi empregado o Ágar Violeta Bile Lactose (Himedia, Índia), em sobrecamada, ambas as placas para mesófilos e enterobactérias foram incubadas a 37°C por 24 horas.

Todo experimento foi conduzido em triplicata com 3 repetições.

3.3 Ativação, manutenção, estocagem e padronização do inóculo

A cepa utilizada no experimento foi *L. monocytogenes* ATCC 19177 cedida pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).

Os inóculos congelados foram reativados em caldo triptona de soja (TSB) adicionado de 0,6% (m/v) de extrato de levedura. Em seguida, 100 µL do inóculo foi transferido para tubos contendo 5 mL de TSB e incubados a 37°C por 24 h. A verificação da pureza das culturas foi feita pelo estriamento de alíquotas das culturas em ágar Oxford e ágar Palcam e incubação a 37°C por 24 h. Após cultivo, as colônias foram repicadas para TSB adicionado de 0,6% de extrato de levedura e incubadas a 37°C por 18 h e identificadas empregando-se a técnica MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of flight).

As culturas estoques foram preparadas pela transferência de alíquotas de 1 mL da cultura para microtubos e centrifugação a 2380 *xg* por 5 min. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e substituído por 1 mL de meio de congelamento (glicerol, 15 mL; peptona bacteriológica, 0,5 g; extrato de levedura, 0,3 g; NaCl, 0,5 g e água destilada, 100 mL, pH 7,0), o material foi homogeneizado e congelado a -18°C para utilização.

As culturas de *L. monocytogenes* foram padronizadas por curva de crescimento. Alíquotas dos inóculos ativados foram transferidas para frascos contendo 300 mL de TSB adicionado de 0,6% (m/v) de extrato de levedura e os frascos foram incubados a 37°C. As absorvâncias das culturas foram periodicamente aferidas (DO 600 nm) em espectrofotômetro e alíquotas plaqueadas em ágar triptona de soja (TSA) adicionado de 0,6% de extrato de levedura. As placas foram incubadas a 37°C por 24 h e as colônias quantificadas. As culturas foram padronizadas em 10⁸ UFC/mL.

3.4 Óleos essenciais e determinação da concentração mínima bactericida (CMB)

Os óleos essenciais de orégano (*Origanum vulgare*), alho (*Allium sativum*), cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*) e coentro (*Coriandrum sativum*) foram adquiridos da empresa FERQUIMA®.

As concentrações mínimas bactericidas (CMB) dos óleos essenciais foram determinadas utilizando-se a técnica de microdiluição em caldo, em microplacas de poliestireno contendo 96 cavidades de acordo com CLSI (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2019), com adaptações.

Os óleos essenciais de alho, coentro, orégano e cravo foram emulsionados em caldo Infusão Cérebro Coração (BHI), acrescido de Tween 80 (0,5%, v/v) e extrato de levedura 0,6%. Foram avaliadas as concentrações de 2; 1; 0,5; 0,25; 0,125 e 0,0625% (v/v). Alíquotas de 150 µL das emulsões foram adicionadas nas cavidades das microplacas seguidas pela inoculação de 10 µL da cultura padronizada de *L. monocytogenes*. As microplacas foram vedadas e incubadas a 37°C por 24 h. Após cultivo, alíquotas de 10 µL de cada cavidade foram transferidas para placas contendo TSA acrescido de 0,6% de extrato de levedura e incubadas a 37°C por 24 h. A concentração mínima bactericida foi definida como a menor concentração onde não houve crescimento de microrganismos em placas.

No experimento foram utilizados dois controles para cada óleo testado, o negativo, contendo caldo BHI, 0,5% de Tween 80 e 0,6% de extrato de levedura, e o controle positivo, contendo caldo BHI acrescido de 0,5% de Tween 80 e 0,6% de extrato de levedura e 10 µL da cultura padronizada. O experimento foi conduzido em triplicata, com três repetições.

3.5 Estudo de sinergismo antimicrobiano entre óleos essenciais

De acordo com a concentração mínima bactericida (CMB) dos óleos essenciais sobre *L. monocytogenes*, foram gerados 27 ensaios (misturas) dos óleos essenciais, pensando em futura aplicação na conservação de embutidos, produzidos com a carne do peixe.

Foi utilizado no experimento um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), com variáveis +2 e -2, definidas com base no resultado da CMB. A variável resposta foi o crescimento de *L. monocytogenes* em placas. Para análise de resultados foi utilizado o software *Chemoface* versão 1.5, utilizando “*Experimental design*”. A Tabela 1 demonstra as 27 misturas de óleos essenciais, geradas pelo DCCR.

Tabela 1 – Variáveis codificadas utilizadas nas combinações dos óleos essenciais para cada delineamento separadamente.

Ensaio	Orégano%	Coentro%	Alho%	Cravo%	Total %
1	0,05	0,05	0,14	0,01	0,25
2	0,05	0,05	0,14	0,03	0,27
3	0,05	0,05	0,41	0,01	0,52
4	0,05	0,05	0,41	0,03	0,54
5	0,05	0,16	0,14	0,01	0,36
6	0,05	0,16	0,14	0,03	0,38
7	0,05	0,16	0,41	0,01	0,63
8	0,05	0,16	0,41	0,03	0,65
9	0,16	0,05	0,14	0,01	0,36
10	0,16	0,05	0,14	0,03	0,38
11	0,16	0,05	0,41	0,01	0,36
12	0,16	0,05	0,41	0,03	0,65
13	0,16	0,16	0,14	0,01	0,47
14	0,16	0,16	0,14	0,03	0,49
15	0,16	0,16	0,41	0,01	0,74
16	0,16	0,16	0,41	0,03	0,76
17	0	0,105	0,275	0,02	0,4
18	0,215	0,105	0,275	0,02	0,615
19	0,105	0	0,275	0,02	0,4
20	0,105	0,215	0,275	0,02	0,615
21	0,105	0,105	0	0,02	0,23
22	0,105	0,105	0,545	0,02	0,775
23	0,105	0,105	0,275	0	0,485
24	0,105	0,105	0,275	0,04	0,525
25	0,105	0,105	0,275	0,02	0,505
26	0,105	0,105	0,275	0,02	0,505
27	0,105	0,105	0,275	0,02	0,505

Fonte: Do autor (2021).

Alíquotas de 150 μ L das emulsões contendo as diferentes concentrações de óleos essenciais preparados em caldo BHI acrescido de 0,6% de extrato de levedura e 0,5% de Tween 80 foram dispensadas nas cavidades das microplacas de poliestireno e inoculadas com 10 μ L da cultura padronizada de *L. monocytogenes*. Em seguida, as placas foram vedadas e incubadas a 37°C por 24 h. Após incubação, alíquotas de 10 μ L de cada cavidade foram transferidas para placas contendo TSA acrescidas de 0,6% de extrato de levedura e incubadas a 37°C por 24 h. O sinergismo antimicrobiano foi avaliado pela ausência de crescimento de colônias em placas. O experimento foi realizado em três repetições, com ensaios em triplicata.

3.6 Elaboração, preparação de amostras e inoculação da bactéria em embutido cozido e curado de peixe

Após avaliação da atividade antimicrobiana sinérgica entre os óleos essenciais, foi escolhido um ensaio para ser utilizado como conservante no embutido cozido e curado de peixe. A formulação utilizada na elaboração do produto está descrita na Tabela 2.

Tabela 2 – Formulação do embutido cozido curado, elaborado com filé e CMS de peixe.

Ingrediente	Quantidade (g)
Filé de tilápia	421,0
CMS de tilápia	344,0
Proteína isolada de soja	10,0
Nitrito de sódio	0,075
Fécula de mandioca	9,0
Eritorbato de sódio	1,91
Sal	12,0
Transglutaminase	9,0
Carragena	3,0
Condimento	7,5
Água	197,3
Corante Carmim de cochonilha	0,076

Fonte: Adaptado de Zanutto (2017).

Inicialmente, as matérias-primas cárneas (CMS e filé) foram pesadas, fragmentadas em processador (modelo All In One PR, Philco, Manaus, AM, Brasil) e os demais ingredientes

proporcionalizados. Em seguida foi elaborada a salmoura, contendo água (0 a 2°C), sal refinado iodado (Cisne®, Cabo Frio, RJ, Brasil), nitrito de sódio (Vetec, Duque de Caxias, RJ, Brasil), condimento presunto califórnia (New Max Industrial, Americana, SP, Brasil), corante de carmim chochonilha (Proteisul, Santo Ângelo, RS, Brasil) e eritorbato de sódio (New Max Industrial, Americana, SP, Brasil). A proteína isolada de soja (New Max Industrial, Americana, SP, Brasil) foi previamente hidratada com água filtrada na proporção de 1:4. A incorporação dos ingredientes ocorreu na seguinte ordem: 1) Combinação da CMS e do filé moído; 2) carragena (New Max Industrial, Americana, SP, Brasil); 3) PIS; e 4) Salmoura.

Logo após a adição da salmoura, foi incorporada na massa a emulsão de óleos essenciais, elaborada com água destilada estéril e 0,5% (v/v) de Tween 80%. A mistura de óleos essenciais selecionada para a condução do experimento foi aquela do ensaio 10 do DCCR contendo os óleos de alho, coentro, cravo-da-índia e orégano, nas concentrações de 0,14; 0,05; 0,03; e 0,16% (v/m), respectivamente.

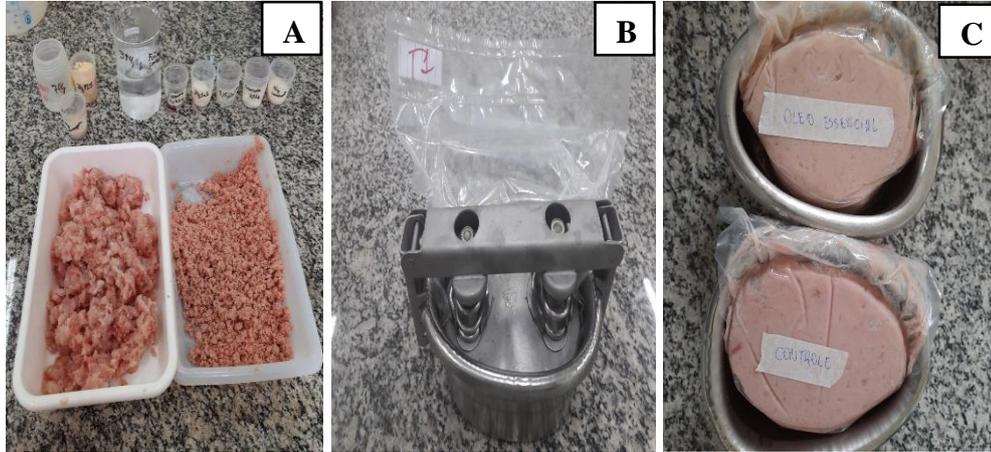
Após a homogeneização da massa, foi adicionada a enzima transglutaminase (Gastrô Brasil Gastronomia, Barueri, SP, Brasil), previamente hidratada com água filtrada na proporção de 1:4. Posteriormente, toda massa foi misturada em *cutter Robot Coupe*, modelo R5 Plus, durante 10 segundos, para que ocorresse a completa homogeneização. Em seguida, o produto foi acondicionado em sacos de polipropileno e armazenado a 7°C por 8 horas, sendo em seguida adicionada a fécula de mandioca (Pachá Alimentos®, Contagem, MG, Brasil), logo após o processo de cura.

Os embutidos foram embalados em sacos nylon poli 180, com peso de 1 kg. Foram selados a vácuo em seladora (modelo TM-250, TecMaq, Pari, SP, Brasil) e prensados, sendo dispostos em forma inox para presunto. Os embutidos foram cozidos em banho-maria (ESTANHOF, Lavras-MG, Brasil). A temperatura do banho-maria foi aumentada gradativamente, na escala de temperatura: 1 h a 60°C; 1 h a 70°C e 30 min a 80°C, até a temperatura interna dos produtos atingirem 72°C, sendo esta a temperatura de pasteurização para produtos cárneos. Após o cozimento os embutidos foram submetidos ao choque térmico em água fria, até atingir a temperatura interna de 40°C.

As amostras destinadas à análise microbiológica foram inoculadas com *L. monocytogenes* (10⁶ UFC/g), homogeneizadas e separadas em porções de 25 g, posteriormente as embalagens foram seladas a vácuo (Sealant TM300, Tecmaq, São Paulo, SP, Brasil) e armazenadas a 10°C durante 12 dias em incubadora tipo B.O.D. (SL-200, SOLAB, Brasil). As amostras destinadas às demais análises não foram inoculadas e armazenadas a 10°C, com peso

de 100 gramas. A Figura 5 demonstra a fragmentação da matéria-prima, prensagem na forma inox para presunto e o produto final.

Figura 5 - Fragmentação das matérias-primas (A), prensagem (B) e o produto final (C).



Fonte: Do autor (2021).

3.7 Contagem de *Listeria monocytogenes* e bactérias lácticas

A contagem de *L. monocytogenes* e de bactérias lácticas foi feita nos embutidos após 0, 3, 6, 9 e 12 dias de armazenamento a 10°C. As embalagens contendo o produto foram abertas assepticamente e homogeneizadas em 225 mL de água peptonada (0,1% m/v) em homogeneizador tipo Stomacher (Metroterm®) por 490 golpes/min por 3 min, seguido de diluições seriadas em água peptonada. Alíquotas de 0,1 mL das diluições adequadas foram plaqueadas em Ágar Palcam (Laborclin, Brasil) e incubadas a 37°C por 48 h, para contagem de *L. monocytogenes*. Já para bactérias lácticas, alíquotas de 1 mL foram inoculadas em ágar *Man Rogosa Shape* (MRS) empregando-se a técnica de plaqueamento em profundidade com sobrecamada. As placas foram incubadas a 28°C por 72 horas. O experimento foi realizado em triplicata e com três repetições.

3.8 Caracterização físico-química dos embutidos

Os embutidos curados cozidos de peixe com diferentes concentrações de óleos essenciais foram avaliados nos tempos 0, 3, 6, 9 e 12 dias de armazenamento a 10°C com 6 repetições. Foram realizadas as análises físico-químicas de pH e atividade de água, assim como as químicas de nitrito residual e oxidação lipídica. Também foi determinada a cor do produto e sua avaliação instrumental.

3.8.1 Análises físico-químicas

3.8.1.1 Atividade de água

A atividade de água foi determinada por meio do aparelho Aqualab® (modelo 4 TE), utilizando-se 10 gramas de amostras de mortadela, a uma temperatura de 25°C.

3.8.1.2 Determinação do pH

Os valores de pH das mortadelas foram determinados pela inserção de um eletrodo de penetração, acoplado a um pH metrodigital (modelo HI 99163, *Hanna Instruments*).

3.8.2 Análises químicas

3.8.2.1 Nitrito residual

O nitrito residual foi determinado de acordo com a metodologia da AOAC n°973.31 (AOAC, 2012), com algumas modificações. A primeira etapa consistiu na extração e sua quantificação foi realizada em espectrofotômetro (modelo SP-220, Biospectro, Curitiba, PR, Brasil) a 540 nm. Para obter os teores de nitrito residual foi utilizada a curva analítica de nitrito de sódio (NO₂), e os valores expressos em mg NO₂.kg⁻¹.

3.8.2.2 Oxidação lipídica (Índice de TBARS)

A oxidação lipídica foi realizada conforme metodologia utilizada por Tarladgis *et al.* (1960), com algumas modificações. Foram pesadas 5 gramas da amostra, adicionado 15 mL de ácido perclórico 3,86% e misturado 1 mL de antioxidante sintético BHT (0,15%) butilhidroxitolueno. A homogeneização da mistura foi feita em equipamento (Turratec TE 102; TECNAL, Piracicaba, SP, Brasil), seguida pelo processo de filtração. Uma alíquota de 5 mL foi, então, adicionada de 5 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,02 M, incubada em banho-maria fervente por 30 minutos. Depois de resfriada à temperatura ambiente, a absorbância foi lida a 532 nm. A concentração de malonaldeído (MAD) foi determinada a partir de curva analítica com 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP) e os resultados expressos em miligramas de malonaldeído por quilograma de amostra (mg de MDA/kg).

3.8.3 Análise física

3.8.3.1 Determinação e avaliação da cor instrumental

Para determinação e avaliação da cor foi utilizado o colorímetro Nix Color Sensor Pro (NPRO; Nix Sensor, Ltd, Burlington, Ontário, Canadá), segundo sugerido por Ramos e Gomide (2007) para carnes in natura. O índice de cor luminosidade (L^*) foi obtido, para cada repetição, considerando-se o valor médio de três leituras realizadas em diferentes pontos da superfície do embutido. A partir dos índices de cor, também foram calculadas as coordenadas polares C^* e H^* (RAMOS; GOMIDE, 2007).

Índice de saturação [$C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$]

Ângulo de tonalidade [$H^* = \tan^{-1}(b^*/a^*)$], expresso em graus.

3.9 Cálculo da velocidade de crescimento

A velocidade de crescimento dos microrganismos avaliados foi calculada através da Equação 1.

$$\begin{aligned}\mu &= \frac{dN}{dt} \\ \ln N - \ln N_0 &= \mu (t - t_0) \\ \log N - \log N_0 &= \frac{\mu}{2,303} (t - t_0) \\ \mu &= \frac{\log N - \log N_0}{t - t_0} 2,303\end{aligned}\quad (1)$$

3.10 Análise estatística dos resultados

Os resultados de enumeração de células vegetativas de *Listeria monocytogenes* e bactéria lácticas foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e posteriormente a uma análise de regressão no *Software Sisvar* versão 5.4 *Build 80* (FERREIRA, 2000).

Em relação às análises físico-químicas, o delineamento utilizado foi um DBC (Delineamento em Blocos Casualizados), em um fatorial 2 x 5 (tratamentos x dias de observação), com 2 blocos, 2 e 6 repetições. Com o objetivo de determinar o efeito da mistura de óleos essenciais, procedeu-se a uma análise de variância (ANOVA) e, posteriormente, quando significativo ($P < 0,05$), aplicou-se o teste de t de Student (LSD) para comparar os

tratamentos e a regressão (linear ou quadrática) para os dias de observação, utilizando o *Software Sisvar* versão 5.4 *Build 80* (FERREIRA, 2000).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Qualidade microbiológica da carne mecanicamente separada (CMS) de peixe

Os resultados das análises microbiológicas da carne mecanicamente separada (CMS) de tilápia demonstram que essa foi obtida em condições higiênico-sanitárias adequadas, uma vez que não foi detectado estafilococos coagulase positiva e as contagens de microrganismos aeróbios mesófilos ($1,0 \times 10^3$ UFC/g) e de enterobactérias ($2,0 \times 10^3$ UFC/g) foram consideradas baixas.

A resolução RDC N° 331, de 23 de dezembro de 2019, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), define os padrões microbiológicos dos alimentos e estipula para carnes e peixes crus o limite de 10^3 UFC/g de estafilococos coagulase positiva presentes nos produtos (BRASIL, 2019). A presença desta bactéria dos alimentos pode indicar falhas higiênicas durante a manipulação dos alimentos. Ela é uma bactéria que habita a pele dos seres humanos, podendo comprometer a qualidade dos alimentos (FRANCO; LANDGRAF, 2008). Entretanto, a mesma Resolução não define padrões microbiológicos para aeróbios mesófilos e enterobactérias em carne mecanicamente separada de peixe (CMS). Muitas das bactérias patogênicas são pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, como *Salmonella*, patótipos de *Escherichia coli*, *Shigella*, dentre outras, podendo causar toxinfecções alimentares nos consumidores. Sua presença nos alimentos em elevadas concentrações indica baixa qualidade higiênico-sanitária do alimento (SILVA *et al.*, 2016b). Estes microrganismos são indicadores de qualidade da matéria-prima e de possíveis falhas na manipulação na indústria (BAUDART, 2011). Seu aumento está relacionado desde à falta de higiene dos manipuladores até o uso inadequado de toucas, além de falhas na higienização de equipamentos e utensílios.

Alguns estudos reportam a presença destes microrganismos em alimentos derivados de peixe. Bordignon *et al.* (2010) estudaram a qualidade microbiológica de CMS de tilápia para elaboração de croquete e encontraram valores de $1,4 \times 10^4$ UFC/g de microrganismos aeróbios mesófilos na amostras analisadas. Como não existe legislação, verificou-se que o Ministério da Saúde preconiza, para peixes crus, refrigerados e congelados, o limite $1,0 \times 10^6$ UFC/g. Em seus estudos, verificaram também que as amostras se encontravam adequadas em relação a legislação para os padrões estafilococos coagulase positiva, similares aos resultados encontrados neste experimento. Lustosa-Neto *et al.* (2018) estudaram a qualidade microbiológica de almôndegas elaboradas com a carne de tilápia e de pirarucu e durante as análises microbiológicas eles verificaram que todas as amostras se encontravam adequadas com

relação a contagem de estafilococos coagulase positiva. Além disso, estava ausente a bactéria salmonela e dentro dos padrões para coliformes a 45°C. Verificaram que todos os padrões microbiológicos das almôndegas foram adequados, durante a vida útil de 90 dias de armazenamento refrigerado.

A matéria-prima de qualidade é essencial na elaboração de novos produtos. Muitos microrganismos são capazes de resistir às condições adversas dentro da indústria, o que os torna capazes de alterar o produto final oferecido ao consumidor.

4.2 Concentração mínima bactericida (CMB) e avaliação das misturas de óleos essenciais

As concentrações mínimas bactericidas dos óleos essenciais de alho, orégano, coentro e cravo-da-índia sobre *L. monocytogenes* foram respectivamente de: 2; 1; 1; e 0,5% (v/v).

Observaram-se diferentes comportamentos de *L. monocytogenes* aos óleos essenciais, sendo o de alho aquele com ação menos efetiva contra a bactéria. Já os óleos de orégano e coentro apresentaram a mesma CMB de 1%, mostrando ação bactericida intermediária, já o cravo foi aquele com maior atividade anti-listerial com CMB de 0,5%. Os óleos essenciais são promissores na conservação dos alimentos (POMBO *et al.*, 2018). Essas diferenças na CMB se dão devido a constituição dos óleos essenciais que se diferem.

Mallet *et al.* (2013) caracterizaram os óleos essenciais de *Allium sativum* e *Origanum vulgare* e identificaram compostos químicos dialil trissulfeto (38,81%), dialil dissulfeto (25,23%) e o metil alil trissulfeto (12,52%) para o alho e 4-terpineol, γ -terpineno, 3-cimeno, para o óleo essencial de orégano. Quando testados *in vitro* quanto à atividade antibacteriana, verificaram-se efeitos satisfatórios sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Segundo Nobre (2021) o óleo essencial de orégano é excelente antimicrobiano, possuindo componentes majoritários como o carvacrol e p-cimeno.

Santos (2018) avaliou a ação antimicrobiana de óleos essenciais e encontrou a CMB de 0,1% para o óleo essencial de orégano sobre *L. monocytogenes in vitro*, sugerindo que o óleo essencial pode ser usado como conservante natural e sanificante na indústria de alimentos. Existem vários constituintes majoritários nos óleos essenciais com efeito antimicrobiano e seus mecanismos de ação ainda são pouco conhecidos. Segundo Bouyahya *et al.* (2019) os óleos essenciais têm como principal alvo a membrana citoplasmática das bactérias. Ao atuarem sobre ela promovem sua desestruturação e o extravasamento do conteúdo celular, interrompendo a produção de energia da células.

Alguns estudos têm demonstrado a ação antibacteriana do óleo essencial de orégano e coentro sobre diversos patógenos alimentares. Araújo *et al.* (2015) estudaram os componentes químicos do óleo essencial de orégano e identificaram como majoritários o 4-terpineol e timol, seguidos pelo α -terpineno, p-cimeno, allocimeno, β -terpineol e acetato de linalina. Quando avaliada a atividade antimicrobiana foram obtidos halos de inibição de 13,5 mm, 27,5 mm e 12,5 mm sobre *E. coli*, *S. aureus* e *Salmonella Choleraesuis* (ATCC 12011). Budeneck, Tolotti e Lenhard-Vidal (2018) estudaram a atividade antimicrobiana do coentro (*Coriandrum sativum*) e verificaram a ação antimicrobiana sobre cepas clínicas de *E. coli*, *S. aureus* e *Candida albicans*.

O cravo-da-índia é uma especiaria muito antiga, tendo atividade antimicrobianas, sobre diversos microrganismos. Martins (2016) avaliou a concentração mínima bactericida do óleo essencial de cravo sobre *L. monocytogenes* e encontrou a CMB de 0,6%, demonstrando a ação antimicrobiana desse óleo essencial. Resultados similares ao encontrado no presente estudo, onde foi encontrado a CMB de 0,5% para o óleo essencial de cravo. Quando utilizado em mortadela verificou-se a redução do número de células no tratamento contendo o óleo essencial de cravo-da-índia.

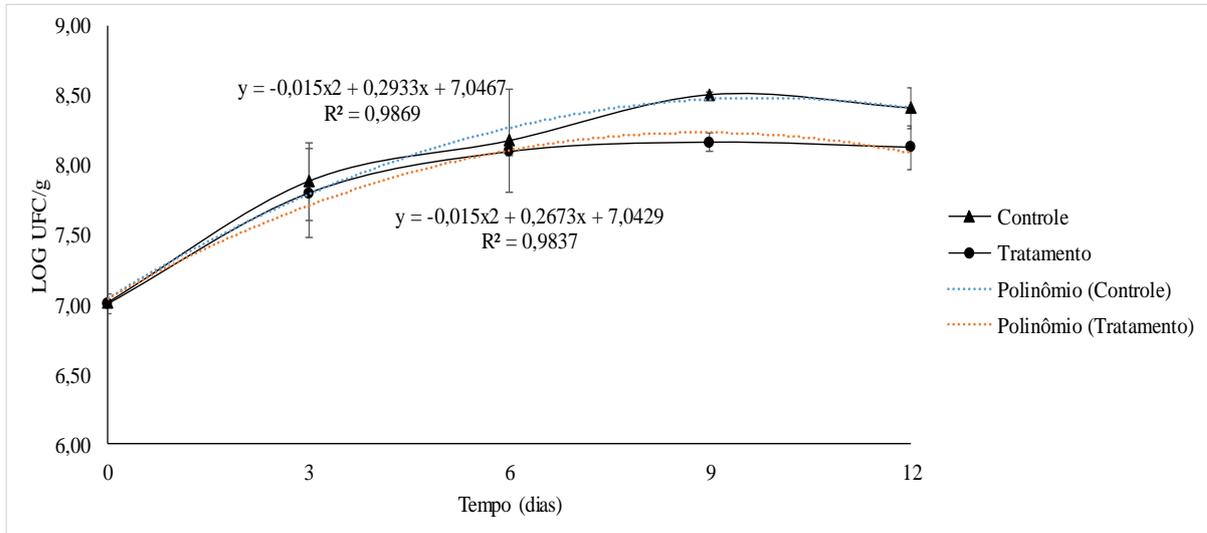
Conhecer o mecanismo de ação do óleo essencial é de suma importância. Quando misturados seu efeito pode ser mais forte, devido a mistura de constituintes químicos e serem capazes de inibir microrganismos como conservantes naturais. Das 27 combinações avaliadas todas inibiram o microrganismo em estudo.

Foi escolhido o ensaio 10, contendo orégano (0,16%), coentro (0,05%), alho (0,14%) e cravo (0,03%), das 27 misturas produzidas pelo DCCR, com aplicação no embutido cárneo cozido curado de peixe, visando promover redução no número de células e manter as características físico-químicas do produto, assim como pesquisas futuras sobre os aspectos sensoriais.

4.3 Inibição de *Listeria monocytogenes* e bactérias lácticas por emulsão de óleos essenciais em embutido cozido e curado de peixe, ao longo de 12 dias, refrigerados a 10°C

A Figura 6 mostra o comportamento de *L. monocytogenes* em presença da mistura dos óleos essenciais adicionados no embutido cozido e curado de peixe ao longo de 12 dias, refrigerados a 10°C.

Figura 6 - Comportamento de *Listeria monocytogenes*, em embutido cozido e curado de peixe pela combinação de óleos essenciais de orégano (0,16%), coentro (0,05%), alho (0,14%) e cravo (0,03%), ao longo de 12 dias de armazenamento, refrigerados a 10°C.



Fonte: Do autor (2021).

Como pode ser observado na Figura 6, até o 3º dia de armazenamento houve aumento do número de *L. monocytogenes*, não sendo observada ação dos óleos essenciais sobre a bactéria, tampouco do nitrito, uma vez que houve crescimento semelhante no tratamento controle. Entretanto, a partir do 6º dia se observou mudança desse comportamento, de crescimento. Vê-se que no 6º dia de armazenamento, em presença de óleos essenciais, a bactéria parece estar entrando na fase estacionária, o que não ocorreu no tratamento controle. Já no 9º dia de armazenamento fica claro que, em presença de óleos essenciais, *L. monocytogenes* já não está se multiplicando. Em detrimento a esse comportamento, em ausência de óleos essenciais o número da bactéria aumentou.

Para melhor avaliar a influência dos óleos essenciais sobre o comportamento de *L. monocytogenes* inoculado no embutido cárneo, foi obtida a velocidade específica de crescimento da bactéria em cada condição.

A velocidade específica de crescimento (μ) foi de 0,21 dias⁻¹ em presença de óleos essenciais e 0,27 dias⁻¹ em ausência dos óleos, demonstrando que houve ação dos conservantes naturais sobre o microrganismo, ao longo de 12 dias de estocagem.

Os testes *in vitro* foram eficazes na inibição do microrganismo em estudo, porém, quando a mistura de óleos essenciais foi aplicada no embutido cozido de peixe, não foi observada a redução do número de UFC/g.

Sabe-se que os óleos essenciais, por serem lipofílicos, tendem a migrar para a fase lipídica do alimento, além disso alimentos com alto teor de proteínas também interferem em

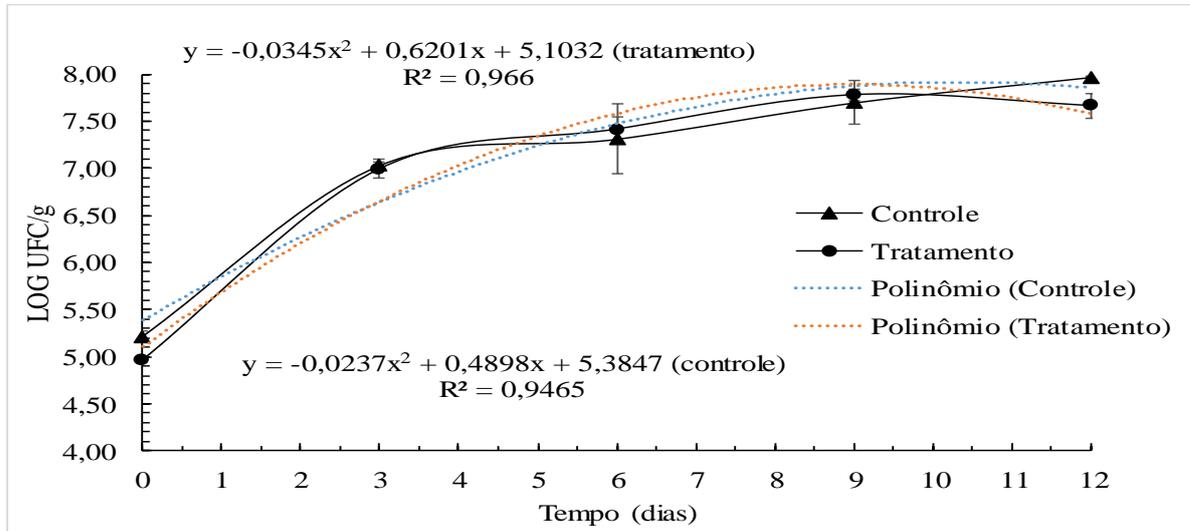
sua ação, uma vez que eles se complexam com elas. De acordo com Pinelli *et al.* (2021), quando a matriz alimentar é complexa ela dificulta o espalhamento da bactéria na amostra, como consequência dificulta a ação dos óleos essenciais.

Neste trabalho, logo no tempo inicial, foi detectada grande quantidade de células, tal fato pode ter sido causado pelo espalhamento da bactéria na amostra. Entretanto, em vários trabalhos publicados se observa que para que os óleos sejam antimicrobianos efetivos nos alimentos, a concentração utilizada sempre é maior que aquela determinada *in vitro* (DIAS, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2012; PINELLI *et al.*, 2021).

Trabalho realizado por Vivian *et al.* (2020) também mostrou que a ação antimicrobiana dos óleos essenciais é diminuída quando utilizados como conservantes em alimentos cárneos. O autor encontrou as concentrações inibitórias dos óleos essenciais de orégano e manjerição sobre *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium in vitro* de 0,5% e 1,0%, respectivamente. Entretanto, apenas a concentração de 1,5% de óleo de orégano foi capaz de inibir *S. Enteritidis* em produto cárneo. Martins (2016) estudou a ação antimicrobiana de compostos naturais como o óleo essencial de cravo-da-índia em mortadela e verificou redução no número de *L. monocytogenes*. Ressaltou, ainda, no seu estudo, que os compostos naturais podem ser utilizados como conservantes naturais na indústria de alimentos.

Muitas das vezes, não só microrganismos patogênicos como a bactéria *Listeria monocytogenes* podem contaminar os alimentos dentro da indústria. O próprio alimento, e suas matérias-primas, já carregam uma carga microbiana, na qual incluem as bactérias lácticas, que acidificam os produtos, causando odores e sabores indesejáveis nos embutidos. Como é observado na Figura 7, a mistura de óleos essenciais não foi capaz de controlar as bactérias lácticas no produto ao longo dos 12 dias de armazenamento.

Figura 7 - Inibição de bactérias lácticas, em embutido cozido e curado de peixe pela combinação de óleos essenciais de orégano (0,16%), coentro (0,05%), alho (0,14%) e cravo (0,03%), ao longo de 12 dias de armazenamento, refrigerados a 10°C.



Fonte: Do autor (2021).

Pode-se observar que houve diferença de 0,26 logUFC/g de bactérias lácticas entre o controle e o tratamento. Entretanto, foi observado o elevado crescimento das bactérias até praticamente o 6º dia de armazenamento, sendo em seguida observada a redução de crescimento celular até o 12º dia de armazenamento. Durante todas as etapas de produção de embutidos cárneos devem ser adotados todos os métodos de higiene, assim como o uso de uma matéria-prima cárnea com qualidade higiênico-sanitária satisfatória. O peixe, assim como o filé, já carrega uma microbiota elevada e muitas bactérias lácticas podem suportar as fases do processamento do alimento. Muitos desses microrganismos deteriorantes podem ser veiculados também pela falta de higienização de equipamento e utensílios, assim como a higiene das mãos, sendo as bactérias lácticas responsáveis por determinar a vida útil do produto.

Pela Figura 7 é observado que houve crescimento de bactérias lácticas em ambos os tratamentos, não provocando redução significativa no número de células vegetativas. Porém, quando calculada a velocidade específica de crescimento, esta foi menor para o tratamento com óleos essenciais ($0,47 \text{ d}^{-1}$), quando comparado com o valor μ para o controle $0,53 \text{ d}^{-1}$.

Alguns estudos têm demonstrado o controle de bactéria láctica em modelos alimentares cárneos. Silveira (2012) estudou a atividade antimicrobiana de extratos vegetais e de óleos essenciais no controle de microrganismos em linguíça frescal. Observou-se aumento de bactérias lácticas já no tempo inicial, verificando que elas estavam em grandes quantidades em ambos os tratamentos, controle e com óleo essencial de louro. Resultados similares foram

encontrados nesse estudo, onde ambos os tratamentos apresentaram população elevada de bactérias lácticas no embutido cozido e curado de peixe.

Entre as principais bactérias deteriorantes de peixes e derivados destacam-se as bactérias do ácido láctico (LYHS, 2009). Pelo produto ser derivado de peixe, e levar junto a CMS, o aumento de bactéria láctica pode ser ocasionado por ser um dos principais microrganismos deteriorantes de peixes. Algumas bactérias ácido lácticas são benéficas em alguns alimentos, porém em produtos cárneos afetam suas características negativamente, quando produzem o ácido láctico, e produzem enzimas como proteases, lipases, causam modificações em seu gosto e sabor (DA SILVA *et al.*, 2017).

Este trabalho demonstrou que não houve diferença significativa quanto à atividade antimicrobiana no tratamento com misturas de óleos essenciais na redução de células vegetativas de *L. monocytogenes* e bactéria lácticas nos embutidos, onde ambos possuíam 75 ppm de nitrito de sódio. Entretanto, através do cálculo da taxa de crescimento, pode-se verificar uma diminuição na taxa de crescimento de *L. monocytogenes* e bactérias lácticas no tratamento com óleos essenciais em relação ao controle. Sugere-se então que os óleos essenciais possam ser inseridos como conservantes naturais em embutidos de peixe, mas deve-se elevar sua concentração ou buscar uma combinação que possa reduzir o microrganismo.

4.4 Caracterização físico-química: Atividade de água (Aw) e pH

A atividade de água (Aw) é um dos fatores intrínsecos responsáveis pelo crescimento microbiano, onde os microrganismos conseguem realizar suas reações bioquímicas (FORSYTHE, 2002). Seu valor nos alimentos indica a água livre que está disponível para os microrganismos se multiplicarem. Por exemplo, as bactérias são mais exigentes quanto a atividade de água, quando comparadas aos fungos e leveduras. Não há alteração microbiana em valores de atividade de água abaixo de 0,60 nos produtos, embora alguns microrganismos possam sobreviver (HOFFMANN, 2001).

Os valores médios de atividade de água (Aw) de embutidos de peixe, contendo ou não óleos essenciais em sua formulação, encontram-se na Tabela 3. Não foi verificado efeito significativo ($P > 0,05$) da mistura de óleos essenciais aos embutidos. Ao longo dos dias (de 0 a 12 dias de armazenamento sob refrigeração) não observou-se modificação significativa nos valores ($P > 0,05$).

Tabela 3 - Valores médios de atividade de água (Aw) do tratamento controle e com adição de misturas de óleos essenciais dos embutidos cozidos e curados de peixe, mantidos refrigerados por 12 dias (10°C).

Tratamentos	Atividade de água (Aw)*
Controle	0,987 a
Tratamento	0,985 a

Controle: sem adição de óleos essenciais; Tratamento (óleos essenciais).

*Letras iguais na mesma coluna não diferem entre si, pelo teste (t) student ao nível de (P<0,05) de significância.

Fonte: Do autor (2021).

Observou-se, entretanto, que os valores para essa variável permaneceram altos em ambos os tratamentos, acima de 0,98. A carne do peixe já é um alimento com alto teor de água e grau de umidade e com elevada atividade de água. Esse ambiente é ideal para que os microrganismos possam realizar suas atividades metabólicas, podendo facilmente se multiplicar (SOARES; GONÇALVES, 2012). Todo microrganismo precisa de água para conseguir se multiplicar. Os embutidos de peixes em geral, emulsionados ou não, apresentam altos valores de atividade de água.

Valores superiores a 0,91 de atividade de água de embutidos fazem com que ocorra o crescimento de bactérias, como *L. monocytogenes*, um patógeno alimentar que se multiplica nesta faixa de atividade de água (FRANCO; LANGRADAF, 2008). Outras bactérias, como as bactérias ácido lácticas (BAL), podem se multiplicar, deteriorando o produto ao longo do armazenamento. Elas consomem os carboidratos dos embutidos e crescem também nos produtos após o processo de cozimento (GOMIDES; RIBEIRO, 2021).

Os embutidos cárneos cozidos formam uma grande quantidade de exsudato após o cozimento (ARAÚJO *et al.*, 2021). Tal processo promove uma redução de água no produto. Apesar das perdas de exsudato no embutido cozido de peixe, os valores de atividade de água (Aw) permaneceram altos neste estudo.

Resultados similares ao deste trabalho foram encontrados por Rodrigues (2014), que verificou, durante as análises tecnológicas de mortadelas com redução de nitrito e adição de óleos essenciais, que não houve diferença significativa entre os tratamentos e os tempos de estocagem analisados, sendo encontrado um valor médio de 0,97 de atividade de água (Aw). Dias (2011), trabalhando também com mortadelas com redução de nitrito e acrescida de misturas de óleos essenciais, encontrou resultados superiores a 0,97 nos valores de atividade de água, verificou que não houve diferença significativa entre os tratamentos e os dias de estocagem avaliados.

Estudos têm demonstrado altos valores de atividade de água para embutidos elaborados com filé e carne mecanicamente separada (CMS) de peixe. Ao desenvolver embutidos tipo salsicha, elaborados com filé e CMS de tilápia, Lago *et al.* (2018) encontraram a média de atividade de água (a_w) de 0,9774 e quando caracterizaram as matérias-primas cárneas, encontraram para a CMS (0,9854) e filé (0,9860). Bernadino Filho *et al.* (2020) desenvolveram embutidos tipo mortadela de tilápia, sabor camarão, e observaram que os valores de atividade de água foram constantes (0,98), sugerindo que esses produtos devem ser mantidos sob refrigeração, podendo, pela elevada A_w , favorecer a multiplicação de microrganismos. Os resultados encontrados nesses trabalhos são similares aos deste estudo.

Foi demonstrado neste trabalho que os óleos essenciais não influenciaram na atividade de água e que, portanto, espera-se que mesmo com essa alta atividade de água haja a inibição do crescimento por outros mecanismos como o pH.

Assim como ocorre com a atividade de água, os microrganismos têm valores de pH mínimo, ótimo e máximo para sua multiplicação. Verifica-se que pH em torno da neutralidade, entre 6,5 e 7,5, é o mais favorável para a maioria dos microrganismos (JAY, 2005). Alguns microrganismos são favorecidos pelo meio ácido, como ocorre com as bactérias lácticas, certamente porque há inibição da microbiota de competição. Os bolores e leveduras mostram maior tolerância ao pH, sendo que os bolores podem multiplicar-se em valores baixos de pH. Entre as bactérias, verifica-se que as patogênicas são as mais exigentes quanto ao pH (FORSYTHE, 2002).

O pH é, assim, um dos fatores intrínsecos responsáveis por influenciar o crescimento microbiano. Na Tabela 4 encontram-se os valores médios para esse parâmetro em embutidos cozidos e curados de peixes, contendo ou não a mistura de óleos essenciais e ao longo dos dias de armazenamento sob refrigeração (0, 3, 6, 9 e 12 dias).

Como pode ser visto pela Tabela 4, nos dias 9 e 12 de estocagem dos embutidos cozidos e curados de peixe houve diferença significativa nos valores médios de pH ($P < 0,05$), sendo que os embutidos que tiveram a adição de óleos essenciais apresentaram valores mais altos de pH que o controle.

Tabela 4 - Valores médios de pH, do tratamento controle e com óleos essenciais dos embutidos cozidos e curados de peixe, ao longo de 12 dias refrigerados a 10°C.

Tratamento	Tempos de estocagem (dias)*				
	0	3	6	9	12
Controle**	6,36 a	6,52 a	6,44 a	6,16 b	5,85 b
Tratamento**	6,38 a	6,47 a	6,46 a	6,34 a	5,97 a

Controle: sem adição de óleos essenciais; Tratamento (óleos essenciais).

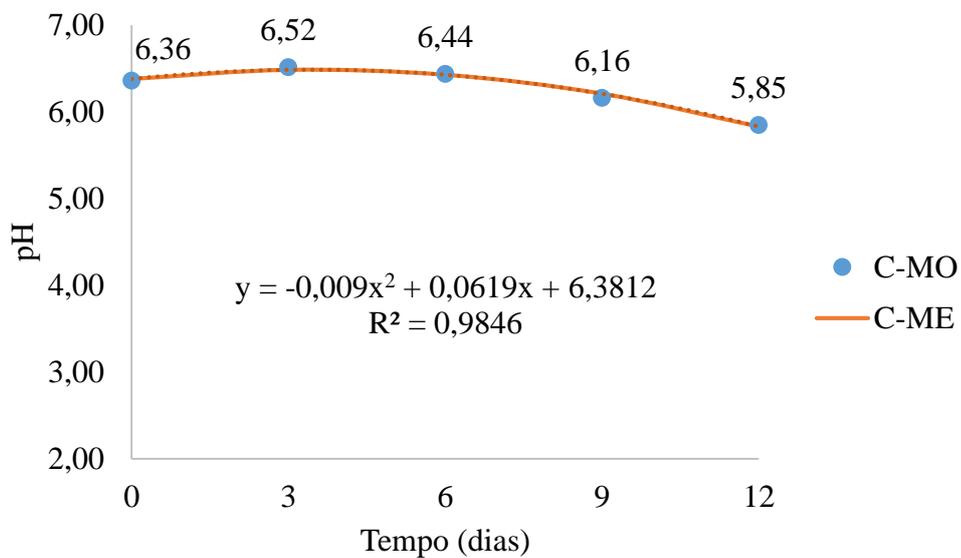
*Letras iguais na mesma coluna não diferem entre si, pelo teste (t) student ao nível de ($P < 0,05$) de significância.

**Efeito quadrático ($P < 0,05$).

Fonte: Do autor (2021).

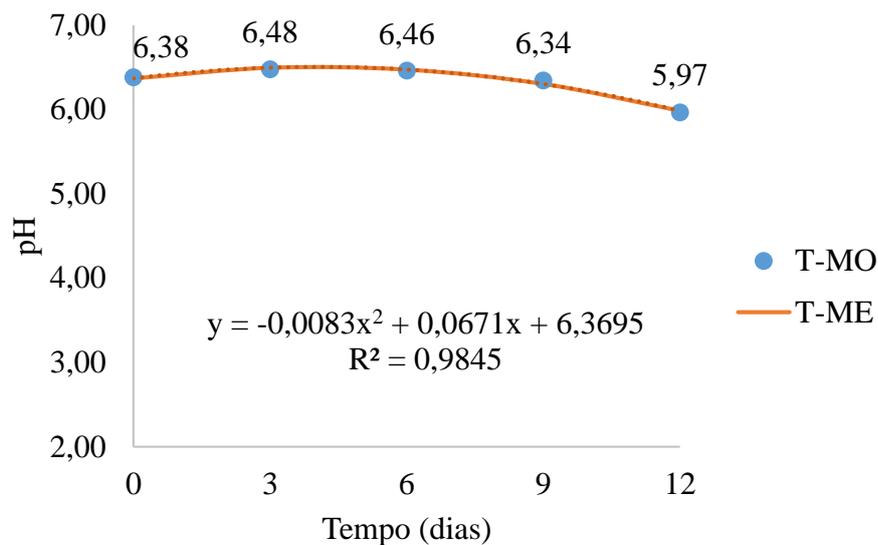
Além disso, efeito quadrático ($P < 0,05$) da passagem dos dias sobre a formulação de embutido, contendo ou não óleos essenciais, ou seja, observou-se o mesmo comportamento. Ou seja, do primeiro para o terceiro dia de observação houve um aumento do valor de pH e, posteriormente, os valores caíram nos dias seguintes, tanto para a formulação controle quanto para a formulação contendo óleos essenciais, chegando, respectivamente, no dia 12, aos valores médios de 5,85 e 5,97, como é demonstrado pela Figura 8.

Figura 8 - Gráficos e coeficientes de regressão do pH dos embutidos cozidos e curados de peixe, sem (A) e com (B) adição de óleos essenciais em sua formulação, ao longo de 12 dias, refrigerados a 10°C.



(a)

Tratamento controle (C-MO médias observadas) e (C-ME médias estimadas).



(b)

Tratamento com óleos essenciais- (T-MO médias observadas) e (T-ME médias estimadas).
Fonte: Do autor (2021).

Os baixos valores de pH dos tratamentos condizem com o aumento na contagem da bactéria láctica. A acidificação do produto nesses tempos de estocagem, em ambos os tratamentos, foi causada pelas bactérias lácticas. Como consequência do baixo pH, o tratamento controle pode ter uma população maior de bactérias lácticas quando comparado ao tratamento com óleos essenciais.

De acordo com Nobre (2011), essas bactérias lácticas conseguem se multiplicar em ambientes refrigerados e ainda manter uma taxa de crescimento alta quando comparada a outros microrganismos, sendo responsáveis por deteriorar produtos cárneos. Como consequência da deterioração elas acidificam os produtos, pois suportam o ambiente ácido. Muitas delas quando deterioram os produtos cárneos, como *Leuconostoc ssp* e *Lactobacilos ssp*, produzem gostos e sabores indesejáveis (FORSYTHE, 2002). As condições do embutido cozido e curado de peixe podem ter favorecido a multiplicação de bactérias lácticas. O próprio ambiente refrigerado, as condições salinas e o ambiente a vácuo favorecem seu crescimento. Como consequência, produzem gás no produto cárneo, além de limosidade, devido a sua atividade metabólica nos alimentos (ZHANG; HOLLEY, 1999).

A ampla faixa de pH do tratamento controle variando do dia 1 (6,36) ao dia 12 (5,85) e do tratamento com adição de óleos essenciais do dia 1 (6,38) ao dia 12 (5,97) de estocagem, pode favorecer também a multiplicação de *Listeria monocytogenes*, pois ela pode suportar condições inóspitas, como a acidez do produto. Segundo Jay (2005) ela se multiplica em uma faixa de pH entre 4,1 a 9,6, onde neste estudo ela pode ser resistente ao pH sendo um dos fatores que influenciaram sua multiplicação.

Alguns trabalhos têm demonstrado a análise de pH de embutidos cárneos emulsionados de peixe. Desenvolvendo embutidos emulsionados, com inclusão de isolado proteico de corvina (*Micropogonias furnieri*), Da Silva *et al.* (2012) encontraram valores de pH variando de 6,47 a 6,93 e, quando avaliada a acidez da polpa de corvina utilizada no experimento, foi de 6,25. Em outros estudos, Mélo *et al.* (2011) caracterizou embutidos emulsionados de linguiça com CMS de tilápia, adicionados de óleo de milho e fibra de trigo, encontraram um pH de 6,6. Alda *et al.* (2021) desenvolveram mortadelas a partir de resíduos de filé (CMS) e estes apresentaram o maior pH 6,71, quando comparados à carne suína e à de frango. Os peixes são animais que possuem um pH próximo da neutralidade (7,0), o que os torna superiores ao de outras carnes comerciais (SOARES; GONÇALVES, 2012).

Estudos com misturas de óleos essenciais e redução de nitrito em produtos cárneos têm demonstrado os valores de pH para emulsionados como a mortadela. Dias (2011), realizando um estudo com mortadelas com diferentes concentrações de nitrito e combinações de óleos essenciais, encontrou valores de pH nos dias 1 (6,71), 10 (6,55) e 20 (6,53) de estocagem. Estudando a aplicação de nanoemulsões de óleos essenciais em mortadelas com redução de nitrito, Pineli *et al.* (2021) encontraram um pH médio de $(6,42 \pm 0,19)$, não verificando efeito ($P > 0,5$), isolado. Neste trabalho, no 12º dia de armazenamento houve um decaimento do pH, o que pode ser associado às bactérias lácticas.

O pH encontrado para o tratamento com misturas de óleos essenciais neste trabalho não foi capaz de inibir a *L. monocytogenes* e bactérias lácticas ao longo de 12 dias de armazenamento, refrigerados a 10°C, mostrando a não efetividade dessa prática, sozinha, e a necessidade de estar aliada ao uso de outras barreiras como o nitrito de sódio, por exemplo, que deve manter suas concentrações residuais ao longo do armazenamento para controlar os microrganismos nos alimentos e prolongar a vida útil.

4.5 Nitrito residual

Os valores de nitrito residual dos embutidos cárneos cozidos curados de peixe, ao longo de 12 dias de armazenamento, estão expressos na Tabela 5, onde se observa que o tratamento com óleos essenciais apresentou maiores valores de nitrito residual em todos os tempos de armazenamento avaliados, quando comparado ao tratamento controle.

Tabela 5 - Valores médios de nitrito residual (NO₂) do tratamento controle e com adição de óleos essenciais dos embutidos cozidos e curados de peixe, ao longo de 12 dias refrigerados a (10°C).

Tratamento	Tempos de estocagem (dias)*				
	0	3	6	9	12
Controle**	70,14 b	64,34 b	60,61 b	53,42 b	33,06 b
Tratamento**	77,28 a	75,75 a	66,97 a	66,75 a	36,71 a

Controle: sem adição de óleos essenciais; Tratamento (óleos essenciais).

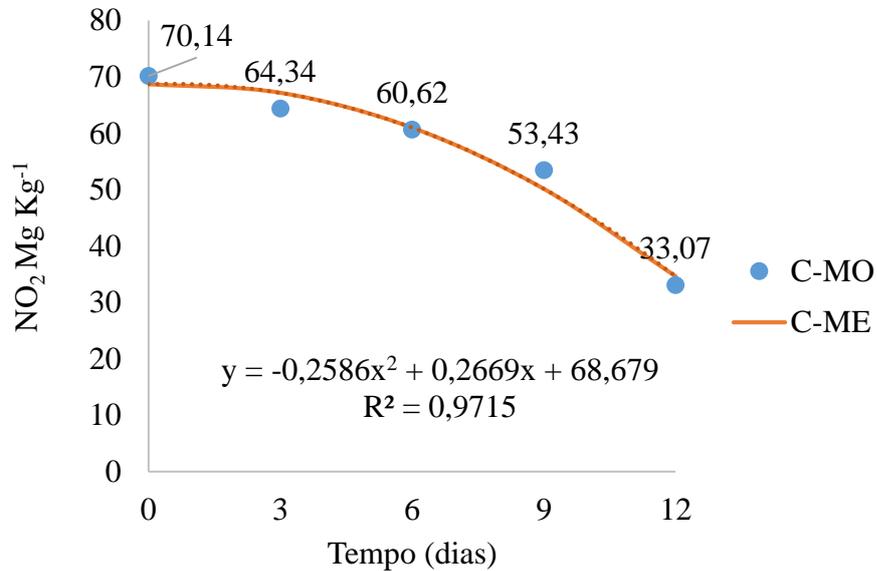
*Letras iguais na mesma coluna não diferem entre si, pelo teste (t) student ao nível de (P<0,05) de significância.

**Efeito quadrático (P<0,01).

Fonte: Do autor (2021).

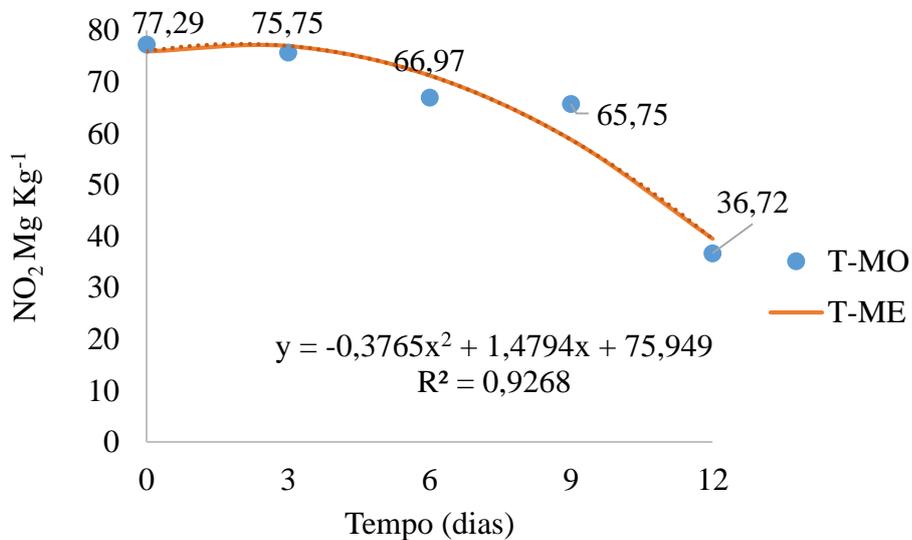
Observou-se também efeito quadrático (P<0,01) dos dias em que foram realizadas as análises, tanto nos embutidos contendo os óleos essenciais quanto no controle, ou seja, observou-se uma redução quadrática (P<0,01) nos valores médios do nitrito residual ao longo do tempo de estocagem, até 12 dias, como pode ser observado pela Figura 9.

Figura 9 – Gráficos e coeficientes de regressão de nitrito residual dos embutidos cozidos e curados de peixe, sem (A) e com (B) adição de óleos essenciais em sua formulação, ao longo de 12 dias, refrigerados a 10°C



(a)

Tratamento controle (C-MO médias observadas) e (C-ME médias estimadas).



(b)

Tratamento com óleos essenciais- (T-MO médias observadas) e (T-ME médias estimadas).

Fonte: Do autor (2021).

O nitrito residual é a quantidade de nitrito de sódio que ainda não reagiu com proteínas, lipídeos, peptídeos, mioglobina, pimentos heme e não heme, assim como metais presentes nos alimentos cárneos (MACDONALD; GRAY; GIBBINS, 1980). O filé de peixe, assim como a CMS e a carne vermelha, apresentam pigmento heme, lipídeos e ferro (DE VASCONCELOS *et al.*, 2016). Nos embutidos de peixe, o nitrito reage com esses pigmentos da carne, dando origem à coloração rósea dos embutidos ao longo do armazenamento.

Muitos fatores têm a capacidade de influenciar na quantidade de nitrito residual, como o tempo de armazenamento, o pH, o tratamento térmico aplicado, assim como a adição de aditivos alimentares, como polifosfatos e ascorbatos na formulação. Os valores de pH baixos dos alimentos também favorecem a diminuição de nitrito. Durante o processamento do alimento, quanto maior o aquecimento, maior a perda de nitrito (CASSENS, 1997).

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), através da Instrução Normativa n.º 51, de 29 de dezembro de 2006, regulamenta que a quantidade de nitrito nos produtos cárneos não deve ultrapassar 150 mg.kg^{-1} (BRASIL, 2006). Esses produtos em grandes quantidades são capazes de produzirem N-Nitrosaminas, substâncias carcinogênicas que causam um risco à saúde do consumidor quando consumidas a longo prazo.

Para que o nitrito de sódio tenha ação antimicrobiana nos alimentos, é necessário 10 mg/Kg de nitrito residual no produto cárneo, sendo que a adição de concentrações inferiores a 150 mg/Kg no produto cárneo final é considerada insuficiente para que estes níveis de nitrito residual sejam obtidos para ter efetividade (CASSENS, 1997). No experimento foram observadas concentrações acima de 10 mg/Kg de nitrito residual nos embutidos cozidos e curados de peixe, ao longo de 12 dias de estocagem, porém mesmo assim houve crescimento de *L. monocytogenes*. O trabalho demonstra que a quantidade adicionada inicialmente não foi suficiente para ter ação antimicrobiana.

Alguns trabalhos têm demonstrado a análise de nitrito residual durante armazenamento em mortadelas com redução de nitrito adicionados de combinações de óleos essenciais. Aleixo (2014), estudando a caracterização físico-química de mortadelas com combinações de óleos essenciais, trabalhando com uma quantidade adicionada inicialmente de 150 ppm, verificou no tempo 0 (32,51) e no de 30 dias de estocagem (19,76) de nitrito residual de sódio. Resultados contrários a este estudo no qual foram observados valores mais altos de nitrito. Dias (2011), ao analisar mortadelas com redução de nitrito (75 ppm) e combinações de óleos essenciais (tomilho, cravo-da-índia e capim-limão), verificou uma redução logo no primeiro dia de 18,73 ppm, o nitrito foi reduzido após os dias de estocagem e ao longo do tempo refrigerado. Os valores foram acima de 10 mg/Kg de nitrito residual, mas não suficientes para inibir os microrganismos, similares a este estudo.

4.6 Oxidação lipídica (TBARS) dos embutidos cozidos e curados de peixe

A avaliação da oxidação lipídica (índice de TBARS) é importante para produtos cárneos, pois quando os embutidos se oxidam podem ocorrer modificações em seus aspectos sensoriais, diminuindo sua aceitabilidade.

Os valores de TBARS (Índice de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico) dos embutidos cozidos e curados de peixe, ao longo de 12 dias de armazenamento, em mg por Kg de malonaldeído, estão expressos na Tabela 6.

Tabela 6 - Valores médios em mg de malonaldeído por kg do tratamento controle e com adição de óleos essenciais dos embutidos cozidos e curados de peixe, ao longo de 12 dias refrigerados a (10°C).

Tratamento	Tempos de estocagem (dias)				
	0*	3	6*	9*	12*
Controle	0,66 b	0,74 a	0,81 b	0,84 b	1,90 b
Tratamento	0,72 a	0,76 a	0,86 a	0,94 a	1,02 a

Controle: sem adição de óleos essenciais; Tratamento (óleos essenciais).

*Letras iguais na mesma coluna não diferem entre si, pelo teste (t) student ao nível de (P<0,05) de significância.

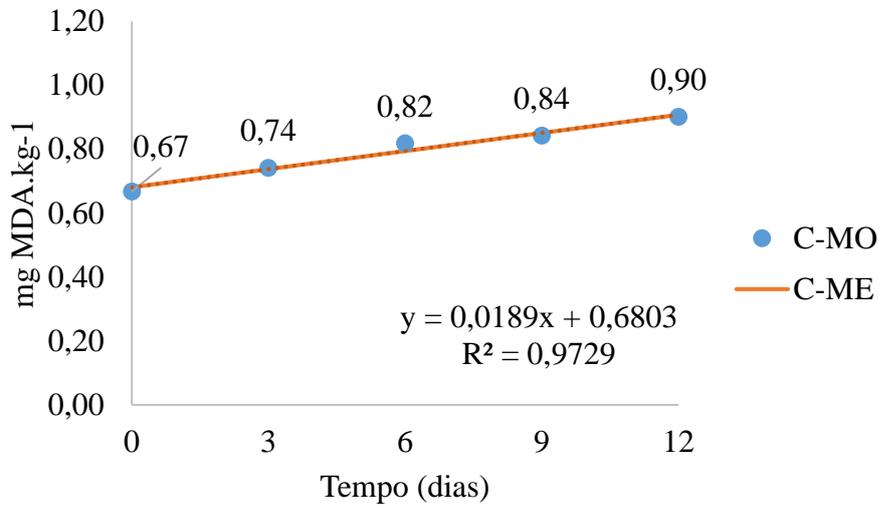
*Efeito linear (P<0,01).

Fonte: Do autor (2021).

Pelo que pode ser observado pela Tabela 6, percebe-se que houve diferença significativa (P<0,01) entres os tratamentos, em todos os dias, exceto no 3º dia de armazenamento, onde não foi observada diferença significativa. (P>0,05). Nos tempos 0, 6 e 9 os valores de TBARS foram maiores nos embutidos que continham os óleos essenciais. Já no 12º dia o valor médio de TBARS foi menor nos embutidos contendo os óleos essenciais.

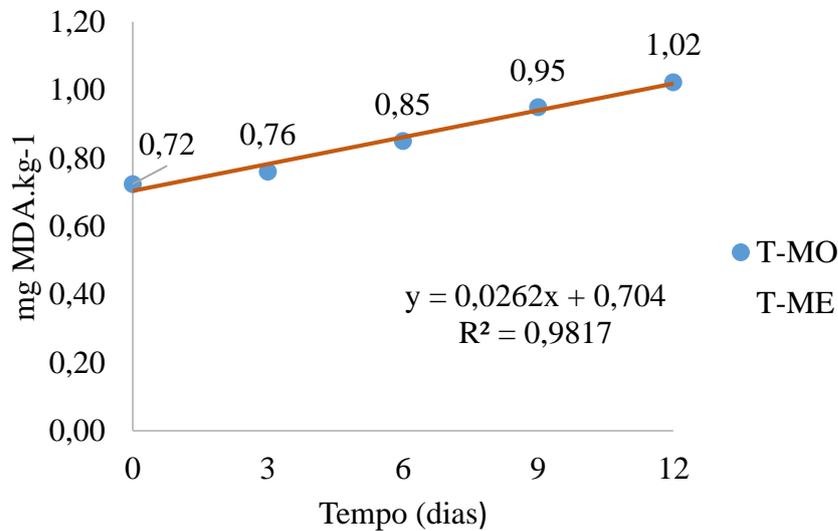
As Figuras 10 e 11 demonstram a oxidação lipídica no produto, ao longo dos 12 dias de armazenamento, evidenciando um efeito linear (P<0,05), ocorrendo um aumento na oxidação lipídica do tratamento com adição das misturas de óleos essenciais

Figura 10 - Gráfico e coeficiente de regressão da concentração de malonaldeído dos embutidos cozidos e curados de peixe, sem adição de óleos essenciais em sua formulação, ao longo de 12 dias, refrigerados a 10°C.



Tratamento controle (C-MO médias observadas) e (C-ME médias estimadas).
Fonte: Do autor (2021).

Figura 11 - Gráfico e coeficiente de regressão da concentração de malonaldeído dos embutidos cozidos e curados de peixe, com adição de óleos essenciais em sua formulação, ao longo de 12 dias, refrigerados a 10°C.



Tratamento com óleos essenciais- (T-MO médias observadas) e (T-ME médias estimadas).
Fonte: Do autor (2021).

O efeito linear ($P < 0,01$) resultou em um aumento da oxidação lipídica do tratamento com óleos essenciais nos tempos 0 (0,7241 mg MDA.kg⁻¹) 6 (0,8500 mg MDA.kg⁻¹), 9 (0,85 mg MDA.kg⁻¹) e 12 (1,0225 mg MDA.kg⁻¹) dias de estocagem sob refrigeração a 10°C, como é observado pelas Figuras 12 e 13.

Os fatores que podem ter influenciado no aumento da oxidação lipídica do embutido podem ser as matérias-primas utilizadas, como o peixe e a carne mecanicamente separada (CMS), devido ao alto teor de gordura. A oxidação lipídica que ocorre nos alimentos é responsável por atuar durante toda sua vida útil. De acordo com Fogaça e Sant'Ana (2009), os peixes e seus derivados são alimentos fáceis de se deteriorar, pois possuem uma alta concentração de ácidos graxos em sua composição, o que aumenta seus valores de oxidação lipídica.

Os óleos essenciais possuem diversas atividades biológicas, nas quais são incluídas a atividade antioxidantes nos alimentos cárneos (ANGIOLETTI *et al.*, 2018). Como observado neste estudo, o tratamento com óleos essenciais não foi capaz de inibir a oxidação lipídica do produto. Quando os óleos essenciais são combinados, ocorre uma mistura de seus componentes químicos e majoritários. Em alguns casos podem ter a ação pró-oxidante nos alimentos, ou seja, aumentam a oxidação lipídica do produto. Alguns trabalhos têm demonstrado essa ação pró-oxidante dos óleos essenciais quando aplicados em matrizes alimentares como mortadela, com redução de nitrito de sódio (DIAS, 2011; MARTINS, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2012).

A ação do nitrito de sódio (NO₂) nos embutidos, além de inibir microrganismos e ter ação antioxidante, também confere a sua cor, a qual pode ser modificada devido reações que ocorrem do nitrito de sódio com a misturas de óleos essenciais em embutidos cárneos.

4.7 Cor instrumental dos embutidos cozidos e curados de peixe

A cor instrumental dos produtos é de extrema importância, visto que produtos cárneos adicionados de óleos essenciais podem modificar alguns parâmetros de cor. E esse é um aspecto que leva o consumidor a comprar o produto e define também seu consumo regular e sua aceitabilidade no mercado (RIZZO; MAURATORE, 2009). A luminosidade (L*) indica a claridade da cor dos produtos. Ela varia do preto (0) ao branco (1), ou seja, quanto maior o valor de L*, mais luminosa é a carne.

Na Tabela 7 são apresentados os valores médios encontrados para luminosidade (L*) dos embutidos cárneos cozidos curados de peixe, ao longo de 12 dias de estocagem.

No presente estudo, a adição dos óleos essenciais contribuiu para maior luminosidade do produto relativamente àquele em que não houve adição dos óleos (P<0,01).

Tabela 7 - Valores médios da luminosidade (L*), do tratamento controle e com adição de óleos essenciais dos embutidos cozidos e curados de peixe, ao longo de 12 dias refrigerados a (10°C).

Tratamentos	Índice de luminosidade (L*)
Controle	57,71 b
Tratamento	59,66 a

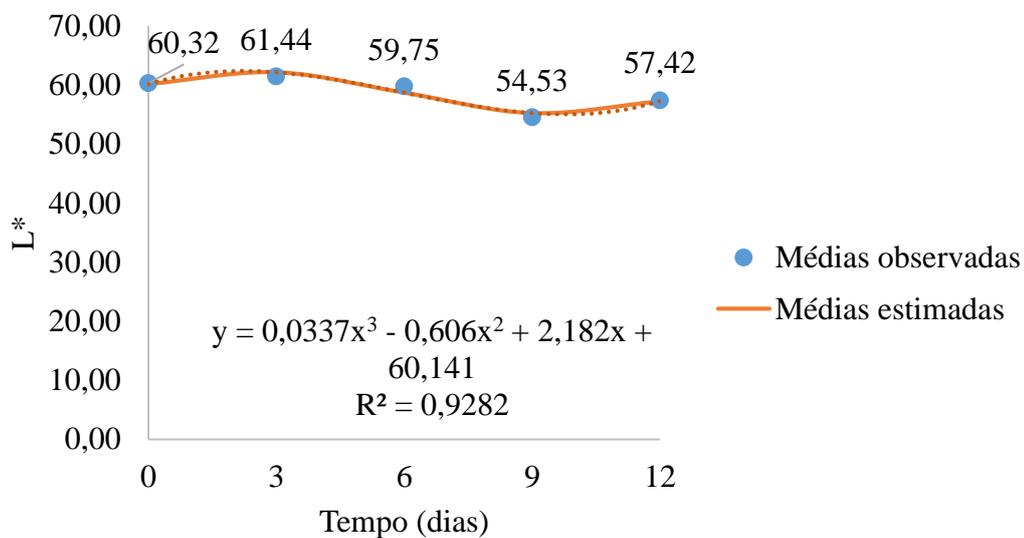
Controle: sem adição de óleos essenciais; Tratamento (óleos essenciais).

Letras iguais na mesma coluna não diferem entre si, pelo teste (t) student ao nível de (P<0,05) de significância.

Fonte: Do autor (2021).

Observa-se na Figura 12 um efeito cúbico (P<0,01) dos dias de observação sobre a variável de L* durante o tempo de estocagem, ou seja, a medida em que os dias passaram, até o 12º dia, ocorreu uma oscilação não explicável na luminosidade dos embutidos, com e sem adição de óleos essenciais.

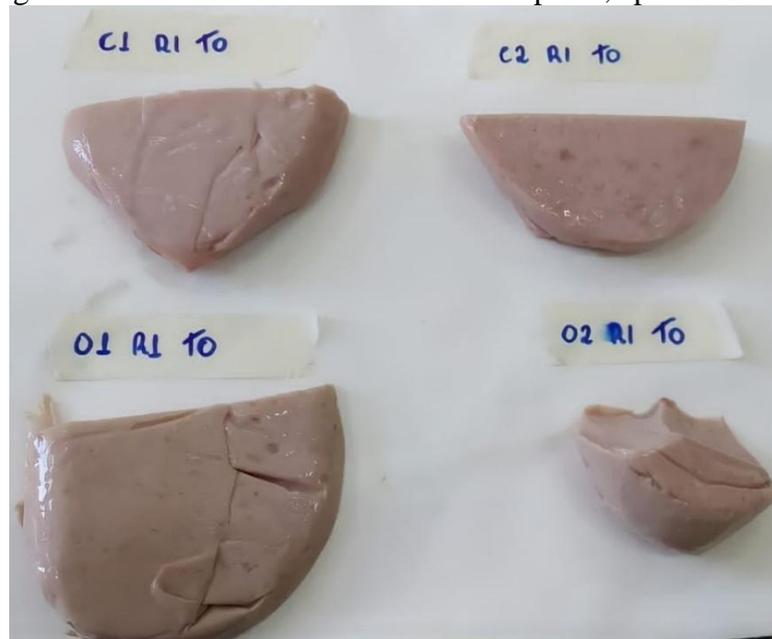
Figura 12 - Gráficos e coeficientes de regressão da Luminosidade (L*) dos embutidos cozidos e curados de peixe, ao longo de 12 dias, refrigerados a 10°C.



Fonte: Do autor (2021).

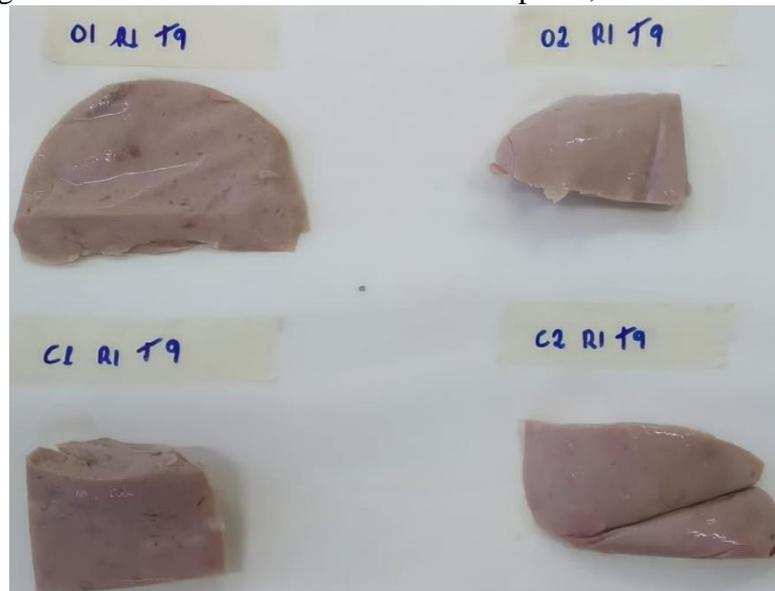
As Figuras 13 e 14 demonstram a imagem do produto no tempo 0 (inicial), ou seja, após a fabricação e no 9º dia de estocagem, podendo diferenciar a cor dos embutidos adicionados de misturas de óleos essenciais, em relação ao tratamento controle.

Figura 13 – Imagem dos embutidos cozidos e curado de peixe, após 24 horas de fabricação.



Fonte: Do autor (2021).

Figura 14 – Imagem dos embutidos cozidos e curado de peixe, no 9º dia de armazenamento.



Fonte: Do autor (2021).

A luminosidade de um produto cárneo é um dos parâmetros mais importantes de cor, porque ela se relaciona com a coloração rósea do embutido (RAMOS; GOMIDE, 2007). Alguns estudos têm demonstrado que há um aumento da claridade, devido à combinação de óleos essenciais com nitrito de sódio, relatados em trabalhos com mortadela (ALEIXO; 2014; DIAS, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2012). O nitrito reage com várias substâncias que são adicionadas nos embutidos. A mistura de óleos essenciais pode ter reagido com o nitrito de sódio, deixando o produto mais claro, como comprovam esses trabalhos.

Bernadino Filho *et al.* (2020), trabalhando com mortadela de tilápia sabor camarão, também encontraram aumento da luminosidade (L^*) quando realizou análises de cor das formulações, apresentando maior média para o parâmetro L^* (61,05), com 0,5% de saborizante sabor camarão. Uma outra sugestão pelo aumento da claridade no tratamento com óleos essenciais nos embutidos é que o nitrito possa ter reagido com o corante carmim cochonilha da formulação. O aditivo de extrato de camarão no estudo citado foi capaz de influenciar a claridade do produto.

Para avaliar a tonalidade da cor dos embutidos utilizou-se o ângulo Hue (H^*) ou ângulo de tonalidade. Este parâmetro traz uma informação sobre as diferentes cores, verde, amarelo, vermelho e azul, sendo uma grandeza física de avaliação da qualidade da cor (RAMOS; GOMIDE, 2007). Pelo que pode ser observado pela Tabela 8, o tratamento com óleos essenciais teve diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao controle, apresentando maior média de 62,32, quando comparado ao controle de 58,80.

Tabela 8 - Valores médios da tonalidade (H^*) do tratamento controle e com adição de óleos essenciais dos embutidos cozidos e curados de peixe, ao longo de 12 dias refrigerados a 10°C.

Tratamento	Índice de tonalidade (H^*)
Controle	58,80 b
Tratamento	63,32 a

Controle: sem adição de óleos essenciais; Tratamento (óleos essenciais).

*Letras iguais na mesma coluna não diferem entre si, pelo teste (t) student ao nível de ($P < 0,05$) de significância.

Fonte: Do autor (2021).

Observando a Tabela 8, pode-se perceber que houve diferença significativa ao longo de 12 dias de estocagem entre os tratamentos, sendo o tratamento com adição de óleos essenciais com o maior valor 63,32, com uma tendência a cor mais amarelada, quando comparado ao controle, com uma média de 58,80. A tonalidade é expressa em cores primárias como o vermelho, verde, amarelo e azul, é representada por duas retas perpendiculares, é um atributo também de cor (RAMOS; GOMIDE, 2007).

O índice de saturação (C^*) indica o “croma”, que também é um importante parâmetro para se avaliar a cor dos alimentos (RAMOS; GOMIDE; 2007).

Na Tabela 9 verificam-se os valores de índice de saturação (C^*), onde se pode perceber que houve diferença significativa ($P < 0,05$) nos tempos 3 e 6 de estocagem.

Tabela 9 - Valores médios do índice saturação (C*) do tratamento controle e com adição de óleos essenciais dos embutidos cozidos e curados de peixe, ao longo de 12 dias refrigerados a 10°C.

Tratamento	Tempos de estocagem (dias)				
	0	3	6	9	12
Controle	8,14 a	6,80 b	7,95 b	7,84 a	7,93 a
Tratamento	8,16 a	7,75 a	8,44 a	8,15 a	8,37 a

Controle: sem adição de óleos essenciais; Tratamento (óleos essenciais).

*Letras iguais na mesma coluna não diferem entre si, pelo teste (t) student ao nível de (P<0,05) de significância.

Fonte: Do autor (2021).

Pela Tabela 9 verifica-se a maior média do tratamento com óleos essenciais nos tempos 3 (7,75) e 6 (8,44), quando comparado ao tratamento controle 3º dia (6,80) e 6º dia (8,44). A intensidade ou quantidade de tonalidade é medida pelo índice de saturação (C*). Ele é uma mistura com branco, preto ou cinza.

No 3º e 6º dia pode se dizer que os produtos se diferenciavam, tendo uma tendência da cor para o amarelado. Estudando a adição de óleo essencial de *Satureja montana*, Oliveira *et al.* (2012) verificaram que ao longo de armazenamento de 30 dias, as mortadelas apresentaram uma redução nos valores de C*. Neste trabalho houve uma diferença significativa (P<0,01) somente nos tempos 3 e 6, não sendo possível observar uma queda deste índice, durante a estocagem de 12 dias, sendo o tratamento com óleos essenciais apresentando maior média. A maior média do tratamento com óleos essenciais do índice de saturação (C*), demonstra que o produto tem uma tendência há uma coloração rósea menos intensa e mais clara, quando comparada ao tratamento controle.

5 CONCLUSÃO

Os óleos essenciais apresentaram ação anti-listerial, sendo o óleo de cravo com a menor CMB de 0,5%. Todas as 27 misturas de óleos essenciais inibiram a *Listeria monocytogenes*, confirmando efeito antilisterial *in vitro*.

A mistura de óleos essenciais não causou uma redução significativa no crescimento de *L. monocytogenes* e bactérias lácticas quando aplicados no embutido cozido e curado de peixe, nos quais diversos fatores podem ter dificultado a sua ação antimicrobiana. Entretanto, quando avaliada a velocidade de crescimento, ela foi menor no tratamento com óleos essenciais, o que demonstra ação antimicrobiana dos conservantes.

Quanto às análises físico-químicas do tratamento com adição de óleos essenciais, a atividade de água e o pH não foram capazes de inibir os microrganismos avaliados, favorecendo, assim, sua multiplicação no produto. Embora outras barreiras químicas como o nitrito de sódio tenham sido utilizadas, suas concentrações residuais ao longo do armazenamento não inibiram *L. monocytogenes*, tampouco bactérias lácticas, o que pode ser um grande problema para a indústria. A adição de óleos essenciais não inibiu a oxidação lipídica ao longo de 12 dias e deixou a cor do embutido mais clara.

Deve-se estudar outros óleos essenciais de plantas condimentares e sua caracterização físico-química. A mistura de óleos e seus componentes neste estudo agiu como pró-oxidantes, apresentando aspecto negativo durante a vida útil do produto.

Sugere-se, então, que os óleos essenciais possam ser utilizados na substituição de aditivos sintéticos como o nitrito de sódio, podendo ser conservantes de embutidos de peixe, mas que se busque uma combinação adequada, assim como usar a nanotecnologia para direcionar a ação antimicrobiana e melhorar os aspectos sensoriais.

REFERÊNCIAS

- ALAGAWANY, M. *et al.* The applications of *Origanum Vulgare* and its derivatives in human, ruminant and fish nutrition – A Review. **Annals of Animal Science**, [Cracow], v. 20, n. 2, p. 389-407, May 2020. Disponível em: <https://www.sciendo.com/article/10.2478/aoas-2020-0004>. Acesso em: 23 jul. 2021.
- ALCÂNTARA, M. de *et al.* Principais microrganismos envolvidos na deterioração das características sensoriais de derivados cárneos. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, Fortaleza, v. 6, n. 1, p. 1-20, jan./jun. 2012. Disponível em: <http://www.higieneanimal.ufc.br/seer/index.php/higieneanimal/article/view/15>. Acesso em: 20 jul. 2021.
- ALDA, P. C. *et al.* Physicochemical and sensory evaluation of mortadella based on Nile tilapia filleting residues. **Ciência Rural**, [Santa Maria], v. 51, n. 3, p. 1-10, Jan. 2021. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cr/a/QFQtq7mhtFmY5DXbCMxSLsv/?lang=en>. Acesso em: 20 jul. 2021.
- ALEIXO, G. de C. **Efeito dos óleos essenciais e compostos majoritários sobre endósporos de *Clostridium botulinum* inoculados em mortadela**. 2014. 58 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.
- ANGIOLETTI, B. L. *et al.* Óleos essenciais com efeito antioxidante e antimicrobiano aplicados em revestimento de carne bovina: uma revisão. **International Journal of Nutrology**, [New York], v. 11, n. S01, p. S24-S327, set. 2018. Disponível em: <https://www.thieme-connect.com/products/ejournals/abstract/10.1055/s-0038-1674909>. Acesso em: 26 jul. 2021.
- AOAC - Association of Official Analytical Chemists. **Official methods of analysis**. 19 th ed. AOAC International Gaithersburg: Association of Official Analytical Chemists, 2012.
- ARAÚJO, C. D. L. de *et al.* Elaboration of chicken sausages with fat reduction and inulin addition. **Brazilian Journal of Food Technology**, [Campinas], v. 24, n. e2019334, p. 1-10, 2021. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/bjft/a/Pz4dJs4mJPNmptFgTk95zyj/abstract/?lang=en&format=html>. Acesso em: 17 jul. 2021.
- ARAÚJO, L. S. *et al.* Composição química e susceptibilidade do óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare* L., família *Lamiaceae*) frente à cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella choleraesuis*. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 33, n. 1, p. 73-78, jan./jun. 2015. Disponível em: <https://revistas.ufpr.br/alimentos/article/view/43808>. Acesso em: 21 jul. 2021.
- BACELAR, R. G. A.; MURATORI, M. C. S. Utilização de resíduos de filetagem de tilápia na tecnologia de alimentos: uma revisão. **Revista Científica Rural**, [Rio Grande do Sul], v. 22, n. 2, p. 263-278, set. 2020. Disponível em: <http://revista.urcamp.tche.br/index.php/RCR/article/view/3278>. Acesso em: 18 jul. 2021.

BARROS, L. *et al.* Phenolic profiles of in vivo and in vitro grown *Coriandrum sativum* L. **Food Chemistry**, [Oxford], v. 132, n. 2, p. 841-848, Jan. 2012. Disponível em: <https://www.semanticscholar.org/paper/Phenolic-profiles-of-in-vivo-and-in-vitro-grown-L.-Barros-Due%C3%B1as/46a31ff0ed8c92d760c5ced7cce7ac6f12c6f824>. Acesso em: 17 jul. 2021.

BATIHA, G. E.-S. *et al.* Chemical constituents and pharmacological activities of garlic (*Allium sativum* L.): A review. **Nutrients**, [Basel], v. 12, n. 3, p. 872, Mar. 2020a. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6643/12/3/872>. Acesso em: 20 jul. 2021.

BATIHA, G. E.-S. *et al.* *Syzygium aromaticum* L.(*Myrtaceae*): Traditional uses, bioactive chemical constituents, pharmacological and toxicological activities. **Biomolecules**, [Basel], v. 10, n. 2, p. 202, Jan. 2020b. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32019140/>. Acesso em: 20 jul. 2021.

BAUDART, J. *et al.* Sensitive counting of viable *Enterobacteriaceae* in seawaters and relationship with fecal indicators. **Journal of Microbiological Methods**, [Amsterdam], v. 84, n. 3, p. 482-485, Mar. 2011. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0167701211000194>. Acesso em: 19 jul. 2021.

BERNADINO FILHO, R. *et al.* Composição química e avaliações físicas de mortadela de tilápia do Nilo com sabor de camarão. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, [Pombal], v. 15, n. 3, p. 250-255, jul./set. 2020. Disponível em: <https://www.gvaa.com.br/revista/index.php/RVADS/article/view/7772>. Acesso em: 20 jul. 2021.

BHUNIA, A. K. **Foodborne microbial pathogens mechanisms and pathogenesis**. New York: Springer LLC, 2008.

BORDIGNON, A. C. *et al.* Elaboração de croquete de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) a partir de CMS e aparas do corte em ‘V’ do filé e sua avaliação físico-química, microbiológica e sensorial. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, Maringá, v. 32, n. 1, p. 109-116, abr. 2010. Disponível em: <https://periodicos.uem.br/ojs/index.php/ActaSciAnimSci/article/view/6909>. Acesso em: 21 jul. 2021.

BOUYAHYA, A. *et al.* Essential oils of *Origanum compactum* increase membrane permeability, disturb cell membrane integrity, and suppress quorum-sensing phenotype in bacteria. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, [Amsterdam], v. 9, n. 5, p. 301-311, Oct. 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2095177918305008>. Acesso em: 23 jul. 2020.

BRAGA, C. M. **Aplicação de radiação ultravioleta na inativação de microrganismos deteriorantes de alimentos**. 2018. 186 p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Instrução Normativa n.º 51 de 29 de dezembro de 2006**. Adota o Regulamento Técnico de Atribuições de Aditivos e seus Limites de uso para a Categoria 8 - Carne e Produtos Cárneos. Brasília, DF: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução - RDC n.º 331, de 23 de dezembro de 2019. Dispõe sobre os padrões microbiológicos de alimentos e sua aplicação, 2019. Publicada no DOU n.º 249, de 26 de dezembro de 2019. **Diário Oficial [da] União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 23 dez. 2019. Seção 1, p. 96.

BUDENECK, M. F.; TOLOTTI, M. F.; LENHARD-VIDAL, A. Efeito antimicrobiano in vitro do óleo essencial de sementes de coentro (*Coriandrum sativum L.*). **Saúde Integral**, [Goiânia], v. 1, n. 1, p. 3-15, 2018.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. **International Journal of Food Microbiology**, [Amsterdam], v. 94, n. 3, p. 223-253, Aug. 2004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15246235/>. Acesso em: 23 jul. 2020.

CARTAXO, J. L. da S. **Riscos associados aos níveis de nitritos em alimentos: uma revisão**. 2015. 30 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Farmácia) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2015.

CASSENS, R. G. Composition and safety of cured meats in the USA. **Food Chemistry**, [Oxford], v. 59, n. 4, p. 561-566, Aug. 1997. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0308814697000071>. Acesso em: 20 jul. 2021.

CLSI - CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Methods for antimicrobial susceptibility of anaerobic bacteria**. 1th ed. Wayne: CLSI document M100, 2019.

CORTÉS-ROJAS, D. F.; DE SOUZA, C. R. F.; OLIVEIRA, W. P. Clove (*Syzygium aromaticum*): a precious spice. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, [Mumbai], v. 4, n. 2, p. 90-96, Feb. 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3819475/>. Acesso em: 18 jul. 2021.

DA COSTA, J. F. *et al.* Utilização de carne mecanicamente separada (CMS) de tilápia na elaboração de farinha com alto valor nutricional. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 42, n. 3, p. 548-565, mar. 2016. Disponível em: https://www.pesca.sp.gov.br/42_3_6BIP548-565_6BIP-019artigo.pdf. Acesso em: 17 jul. 2021.

DA SILVA, G. P. R. *et al.* Embutido emulsionado com adição de isolado proteico à base de pescado (*Micropogonias furnieri*). **Unoesc & Ciência - ACET**, Joaçaba, v. 3, n. 2, p. 179-186, jul./dez. 2012. Disponível em: <https://portalperiodicos.unoesc.edu.br/acet/article/view/2112>. Acesso em: 23 jul. 2021.

DA SILVA, N. *et al.* **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. 5. ed. São Paulo: Editora Blucher, 2017.

DE SOUZA, S. P. *et al.* Óleos essenciais como inibidores da acetilcolinesterase. **Revista Fitos Eletrônica**, Jacarepaguá, v. 7, n. 4, p. 259-266, out. 2013. Disponível em: <https://revistafitos.far.fiocruz.br/index.php/revista-fitos/article/view/161>. Acesso em: 20 jul. 2021.

DE VASCONCELOS, E. L. Q. *et al.* Crioprotetores na estabilidade do surimi de matrinxã (*Brycon amazonicus* Spix e Agassiz 1819) sob congelamento. **PUBVET**, Maringá, v. 10, n. 4, p. 271-355, abr. 2016. Disponível em: <https://www.pubvet.com.br/artigo/2783/crioprotetores-na-estabilidade-do-surimi-de-matrinxatilde-brycon-amazonicus-spix-e-agassiz-1819-sob-congelamento>. Acesso em: 18 jul. 2021.

DIAS, N. A. A. **Avaliações microbiológica e físico-química de mortadelas elaboradas com óleos essenciais e inoculadas com *Clostridium perfringens* tipo A**. 2011. 111 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

FARIA, J. A. F. *et al.* Formação e estabilidade da cor de produtos cárneos curados. **Revista Tecnologia de Carnes**, Campinas, v. 3, n. 2, p. 16-22, 2001. Disponível em: <https://doczz.com.br/doc/684826/forma%C3%A7%C3%A3o-e-estabilidade-da-cor-de-produtos-c%C3%A1rneos-curados>. Acesso em: 25 jul. 2021.

FERREIRA, D. F. **Manual do sistema Sisvar para análises estatísticas**. Lavras: Ed. UFLA, 2000.

FOGAÇA, F. H. dos S.; SANT'ANA, L. S. Oxidação lipídica em peixes: mecanismo de ação e prevenção. **Archives of Veterinary Science**, Curitiba, v. 14, n. 2, p. 117-127, set. 2009. Disponível em: <https://revistas.ufpr.br/veterinary/article/view/13995>. Acesso em: 26 jun. 2020.

FORSYTHE, F. J. **Microbiologia da segurança alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2002.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2008.

FRATUCCI, A.; SILVA, L.; GUEDES, M. do C. S. Nitratos, nitritos e n-nitrosaminas: Efeitos no organismo. **Revista Eletrônica FACP**, [Paulínia], n. 12, p. 40-55, out. 2017. Disponível em: <http://revista.facp.com.br/index.php/reFACP/article/view/56>. Acesso em: 27 jun. 2020.

GAVARIC, N. *et al.* Perfil químico, atividade antioxidante e antibacteriana dos óleos essenciais de tomilho e orégano, timol e carvacrol e seu possível sinergismo. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, [Índia], v. 18, n. 4, p. 1013-1021, Sept. 2015. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/0972060X.2014.971069>. Acesso em: 20 jul. 2021.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos: qualidade das matérias-primas, doenças transmitidas por alimentos, treinamento de recursos humanos**. 5. ed. Barueri: Manole, 2015.

GOMIDES, E. T.; RIBEIRO, L. F. Determinação de microrganismos deteriorantes em linguiça calabresa, antes e após o cozimento. **Revista GETEC**, [Monte Carmelo], v. 10, n. 29, p. 122-137, 2021. Disponível em: <https://www.fucamp.edu.br/editora/index.php/getec/article/view/2408>. Acesso em: 23 jul. 2021.

GUIMARÃES, J. de L. B.; CALIXTO, F. A. A.; MESQUITA, E. de F. M. de. Produção e utilização da carne mecanicamente separada de pescado: Uma revisão. **Higiene Alimentar**, [São Paulo], v. 31, n. 268/269, p. 31-35, maio/jun. 2017. Disponível em: <https://docs.bvsalud.org/biblioref/2017/07/837454/268-269-site-31-35.pdf>. Acesso em: 23 jul. 2020.

HARRIS, J. C. *et al.* Propriedades antimicrobianas de *Allium sativum* (alho). **Microbiologia Aplicada e Biotecnologia**, [Belo Horizonte], v. 57, n. 3, p. 282-286, 2001.

HOFFMANN, F. L. Fatores limitantes à proliferação de microorganismos em alimentos. **Brasil Alimentos**, [São José do Rio Preto], n. 9, p. 23-30, jul./ago. 2001. Disponível em: <http://www.signuseditora.com.br/ba/pdf/09/09%20-%20higiene.pdf>. Acesso em: 16 jun. 2020.

ISO - INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 9235**. Aromatic natural Raw Materials: Vocabulary, item 2.11. Genebra, 2013. Disponível em: <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:9235>. Acesso em: 5 jul. 2021.

IZIDORO, M. *et al.* Propriedades funcionais e organolépticas de plantas condimentares: Revisão. **Research, Society and Development**, [Vargem Grande Paulista], v. 10, n. 6, p. 1-13, jan. 2021. Disponível em: https://redib.org/Record/oai_articulo3222196-propriedades-funcionais-e-organol%C3%A9pticas-de-plantas-condimentares-revis%C3%A3o. Acesso em: 16 jul. 2021.

JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

LAGO, A. M. T. *et al.* Fish sausages prepared with inclusion of Nile tilapia minced: Correlation between nutritional, chemical, and physical properties. **Journal of Food Processing and Preservation**, Malden, v. 42, n. 10, p. 1-11, Oct. 2018. Disponível em: <https://ifst.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/jfpp.13716>. Acesso em: 30 jun. 2021.

LAMARINO, L. Z. *et al.* Nitritos e nitratos em produtos cárneos enlatados e/ou embutidos. **Gestão em Foco**, [Amparo], n. 7, p. 246-251, 2015. Disponível em: https://portal.unisepe.com.br/unifia/wp-content/uploads/sites/10001/2018/06/22nitritos_nitratos.pdf. Acesso em: 26 jun. 2020.

LARIBI, B. *et al.* Coriander (*Coriandrum sativum* L.) and its bioactive constituents. **Fitoterapia**, [Amsterdam], v. 103, p. 9-26, June 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25776008/>. Acesso em: 27 jun. 2021.

- LEÃO, L. L. *et al.* Uso de antioxidantes naturais em carnes e seus subprodutos. **Caderno de Ciências Agrárias**, [Montes Claros], v. 9, n. 1, p. 94-100, abr. 2017. Disponível em: <https://periodicos.ufmg.br/index.php/ccaufmg/article/view/2951>. Acesso em: 26 jul. 2020.
- LEONARDI, J. G.; AZEVEDO, B. M. Métodos de conservação de alimentos. **Revista Saúde em Foco**, Teresina, n. 10, p. 51-61, 2018. Disponível em: https://portal.unisepe.com.br/unifia/wp-content/uploads/sites/10001/2018/06/006_M%C3%89TODOS_DE_CONSERVA%C3%87%C3%83O_DE_ALIMENTOS.pdf. Acesso em: 26 jul. 2020.
- LÍRIO, T. F.; BRITO, B. M. da S.; ANTUNES, W. L. Avaliação dos níveis de nitrito em salsichas comercializadas na cidade de Macaé/RJ. **Revista de Engenharias da Faculdade Salesiana**, [Macaé], n. 6. p. 10-14, 2017. Disponível em: http://www.fsma.edu.br/RESA/Edicao6/FSMA_RESA_2017_2_02.pdf. Acesso em: 26 jul. 2021.
- LUSTOSA-NETO, A. D. *et al.* Almôndegas de pirarucu e tilápia nilótica: caracterização e aplicação na merenda escolar. **ActaFish**, [Sergipe], v. 6, n. 2, p. 1-12, out. 2018. Disponível em: <https://www.seer.ufs.br/index.php/ActaFish/article/view/10727>. Acesso em: 25 jul. 2021.
- LYHS, U. Microbiological methods. **In Fishery Products: Quality, safety and authenticity**. Oxford: Wiley-Blackwell, 2009.
- MACDONALD, B.; GRAY, J. I.; GIBBINS, L. N. Role of nitrite in cured meat flavor: antioxidant role of nitrite. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 45, n. 4, p. 893-897, July 1980. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2621.1980.tb07473.x>. Acesso em: 28 jul. 2021.
- MACHADO, T. M. *et al.* Utilização da enzima transglutaminase em medalhões de aparas e CMS de espinhaço de tilápia. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 40, n. 4, p. 617-627, ago. 2018. Disponível em: https://www.pesca.sp.gov.br/40_4-617-627.pdf. Acesso em: 20 jun. 2021.
- MALLET, A. C. T. *et al.* Composição química de óleos essenciais condimentares e suas atividades antioxidante e antibacteriana. **Higiene Alimentar**, [São Paulo], v. 27, n. 224/225, p. 108-112, set./out. 2013. Disponível em: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/vti-12953>. Acesso em: 20 jul. 2021.
- MANDAL, S.; MANDAL, M. Coriander (*Coriandrum sativum L.*) essential oil: Chemistry and biological activity. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, [Mumbai], v. 5, n. 6, p. 421-428, June 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2221169115000647>. Acesso em: 20 jun. 2021.
- MARTINS, A. P. **Atividade bactericida de antimicrobianos naturais sobre *Listeria monocytogenes* inoculada em mortadela**. 2016. 163 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2016.

MARTINS, A. P. **Atividade de antimicrobianos naturais sobre endósporos de *Clostridium perfringens* em mortadelas**. 2013. 123 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

MATEUS, T. L. *et al.* *Listeria e Listeria monocytogenes* em alimentos. **Tecno Alimentar – Revista da Indústria Alimentar**, [Porto], n. 12, p. 56-59, jan. 2018. Disponível em: <http://www.tecnoalimentar.pt/noticias/listeria-e-listeria-monocytogenes-em-alimentos/>. Acesso em: 30 jun. 2021.

MEZARROBA, M. E. de P. C. *et al.* Estimativa da vida útil e dos parâmetros de crescimento de bactérias ácido-lácticas em filés de peito de frango resfriados embalados a vácuo e com atmosfera modificada. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 34, n. 1, p. 1-14, jan./jun. 2016. Disponível em: <https://revistas.ufpr.br/alimentos/article/view/48968>. Acesso em: 24 jul. 2021.

MÉLO, H. M. G. *et al.* Viabilidade da utilização da carne mecanicamente separada (CMS) de Tilápia do Nilo na elaboração de um produto tipo mortadela. **Ars Veterinária**, Jaboticabal, v. 27, n. 1, p. 22-29, mar. 2011. Disponível em: <http://www.arsveterinaria.org.br/ars/article/view/367>. Acesso em: 24 jul. 2021.

MORSHEDLOO, M. R. *et al.* Essential oil profile of oregano (*Origanum vulgare* L.) populations grown under similar soil and climate conditions. **Industrial Crops and Products**, [Amsterdam], v. 119, p. 183-190, Sept. 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0926669018302723>. Acesso em: 30 jun. 2021.

NAZZARO, F. *et al.* Effect of essential oils on pathogenic bacteria. **Pharmaceuticals**, Amsterdam, v. 6, n. 12, p. 1451-1474, Dec. 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3873673/>. Acesso em: 30 jun. 2021.

NOBRE, F. S. D. **Identificação de microrganismos patógenos, deteriorantes e bactérias lácticas em linguças suínas e avaliação do potencial efeito probiótico**. 2011. 137 p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

NOBRE, M. S. V. *et al.* Atividade antibacteriana do óleo essencial de *Origanum vulgare* frente a *Staphylococcus* sp. Isolados do queijo minas artesanais. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v. 7, n. 4, p. 38712-38720, abr. 2021. Disponível em: <https://www.brazilianjournals.com/index.php/BRJD/article/view/28231>. Acesso em: 17 jul. 2021.

OLIVEIRA, F. S. **Atividade antioxidante e antimicrobiana de óleos essenciais aplicados na conservação de linguça frescal de frango**. 2017. 62 p. Dissertação (Mestrado em Produção Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais, Montes Claros, 2017.

OLIVEIRA, T. L. C. de *et al.* Antioxidant effects of *Satureja montana* L. essential oil on TBARS and color of mortadella-type sausages formulated with different levels of sodium nitrite. **LWT-Food Science and Technology**, [Amsterdam], v. 45, n. 2, p. 204-212, Mar. 2012. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643811002933>. Acesso em: 15 jul. 2021.

PESAVENTO, G. *et al.* Antibacterial activity of orégano, rosmarinus and thymus essential oils against *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in beet meat balls. **Food Control**, [Oxford], v. 54, p. 188-199, Aug. 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S095671351500078X>. Acesso em: 30 jun. 2020.

PEZZANI, R.; VITALINI, S.; IRITI, M. Bioactivities of *Origanum vulgare L.*: an update. **Phytochemistry Reviews**, [Dordrecht], v. 16, n. 6, p. 1253-1268, Sept. 2017. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11101-017-9535-z>. Acesso em: 30 jun. 2021.

PINELLI, J. J. *et al.* Essential oil nanoemulsions for the control of *Clostridium sporogenes* in cooked meat product: An alternative? **LWT-Food Science and Technology**, [Amsterdam], v. 143, May 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0023643821002760>. Acesso em: 22 jul. 2021.

PINTO, B. V. V. *et al.* O resíduo de pescado e o uso sustentável na elaboração de coprodutos. **Revista Mundi Meio Ambiente e Agrárias**, Curitiba, v. 2, n. 2, p. 1-26, jul./dez. 2017. Disponível em: <https://periodicos.ifpr.edu.br/index.php?journal=MundiMAA&page=article&op=view&path%5B%5D=223>. Acesso em: 14 jul. 2021.

POMBO, J. C. P. *et al.* Efeito antimicrobiano e sinérgico de óleos essenciais sobre bactérias contaminantes de alimentos. **Segurança Alimentar e Nutricional**, Campinas, v. 25, n. 2, p. 108-117, maio/ago. 2018. Disponível em: <https://periodicos.sbu.unicamp.br/ojs/index.php/san/article/view/8651785>. Acesso em: 23 jun. 2020.

PRACHAYASITTIKUL, V. *et al.* Coriander (*Coriandrum sativum*): A promising functional food toward the well-being **Food Research International**, [Amsterdam], v. 105, p. 305-323, Mar. 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0963996917307901>. Acesso em: 30 jun. 2021.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, [São Paulo], v. 29, n. 4, p. 755-760, jan. 2006. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/7QPfMbDGVjFgdBGNsCCvhpm/?format=pdf&lang=en>. Acesso em: 27 jun. 2020.

RAMOS, E. M.; GOMIDE, L. A. M. **Avaliação da qualidade de carnes: fundamentos e metodologias**. 2. ed. Viçosa: Editora UFV, 2007.

RAO, J.; CHEN, B.; MCCLEMENTS, D. J. Improving the efficacy of essential oils as antimicrobials in foods: Mechanisms of action. **Annual Review of Food Science and Technology**, [Palo Alto], v.10, p. 365-387, Jan. 2019. Disponível em: <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-food-032818-121727>. Acesso em: 27 jun. 2020.

REIS, J. B. *et al.* Avaliação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais contra patógenos alimentares. **Brazilian Journal of Health Review**, Curitiba, v. 3, n. 1, p. 342-363, jan./fev. 2020. Disponível em: <https://www.brazilianjournals.com/index.php/BJHR/article/view/6223>. Acesso em: 27 jun. 2020.

RIZZO, V.; MURATORE, G. Effects of packaging on shelf life os fresh celery. **Journal of Food Engineering**, [Oxford], v. 90, n. 1, p. 124-128, Jan. 2009. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0260877408002847>. Acesso em: 24 jul. 2021.

RODRIGUES, L. T. de S. **Atividade antimicrobiana de óleos essenciais sobre *Clostridium botulinum* inoculado em mortadela**. 2014. 98 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.

SANTOS, J. M. P. **Adaptação e adaptação cruzada de *Listeria* spp. a óleos essenciais de plantas condimentares e ao estresse ácido**. 2018. 56 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares) – Universidade Federal de Lavras, Lavras. 2018.

SARAIVA, M. D. C. *et al.* Uma reflexão sobre o botulismo alimentar (*Clostridium botulinum*). **DESAFIOS - Revista Interdisciplinar da Universidade Federal do Tocantins**, [Palmas], v. 3, n. 2, p. 26-35, nov. 2016. Disponível em: <https://sistemas.uft.edu.br/periodicos/index.php/desafios/article/view/2038>. Acesso em: 23 jun. 2020.

SARTORI, A. G. de O.; AMANCIO, R. D. Pescado: importância nutricional e consumo no Brasil. **Segurança Alimentar e Nutricional**, Campinas, v. 19, n. 2, p. 83-93, fev. 2012. Disponível em: <https://periodicos.sbu.unicamp.br/ojs/index.php/san/article/view/8634613>. Acesso em: 18 jun. 2020.

SHANG, A. *et al.* Bioactive compounds and biological functions of garlic (*Allium sativum* L.). **Foods**, [Basel], v. 8, n. 7, p. 246, July 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31284512/>. Acesso em: 27 jun. 2021.

SHARMA, H. *et al.* Use of various essential oils as bio preservatives and their effect on the quality of vacuum packaged fresh chicken sausages under frozen conditions. **LWT-Food Science and Technology**, [Amsterdam], v. 81, p. 118-127, Aug. 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0023643817302013>. Acesso em: 10 jun. 2020.

SILVA, H. R. *et al.* Listeriose: Uma doença de origem alimentar pouco conhecida no Brasil. **Higiene Alimentar**, [São Paulo], v. 30, n. 262/263, p. 17-20, dez. 2016a. Disponível em: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/biblio-827444>. Acesso em: 10 jun. 2021.

SILVA, R. X. *et al.* Qualidade higiênico-sanitária da tilápia (*Oreochromis* spp.) fresca e congelada em mercados públicos. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 17, n. 4, p. 574-580, out./dez. 2016b. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cab/a/qXH63yvfx7JSYJPBmZbZP3h/abstract/?lang=pt>. Acesso em: 20 jun. 2021.

SILVEIRA, S. M. da. **Avaliação da atividade antimicrobiana e antioxidante de extratos vegetais e óleos essenciais e aplicação do óleo essencial de louro (*L. nobilis*) como agente conservador natural em embutido cárneo frescal**. 2012. 215 p. Dissertação (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

SIMÕES, C. M. D. O. *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: UFSC/UFRGS, 2007. 1104 p.

SIQUEIRA, M. G. F. M. de *et al.* Detection of *Listeria* spp. in food handling areas of retail food stores in the state of Pernambuco, Brazil. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 20, p. 1-7, June 2017. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/bjft/a/VzgG4qvHQ357BMY6YQSJ3mP/?lang=en>. Acesso em: 10 jun. 2020.

SOARES, K. M. de P.; GONÇALVES, A. A. Qualidade e segurança do pescado. **Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso)**, São Paulo, v. 71, n. 1, p. 1-10, jan. 2012. Disponível em: http://periodicos.ses.sp.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0073-98552012000100001&lng=pt&tlng=pt. Acesso em: 11 jun. 2020.

TARIQ, S. *et al.* A comprehensive review of the antibacterial, antifungal and antiviral potential of essential oils and their chemical constituents against drugresistant microbial pathogens. **Microbial Pathogenesis**, [London], v. 134, Sept. 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31195112/>. Acesso em: 11 jun. 2020.

TARLADGIS, B. G. *et al.* A distillation method for the quantitative determination of malonaldehyde in rancid foods. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Champaign, v. 37, n. 1, p. 44-48, Jan. 1960. Disponível em: <https://aocs.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1007/BF02630824>. Acesso em: 10 jun. 2020.

TILNEY, L. G.; PORTNOY, D. A. Actin filaments and the growth, movement, and spread of the intracellular bacterial parasite, *Listeria monocytogenes*. **Journal of Cell Biology**, [New York], v. 109, n. 4, p. 1597-1608, Oct. 1989. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2115783/>. Acesso em: 25 jun. 2020.

VIEIRA, N. B. **Avaliação físico-química de embutidos cárneos cozidos tipo mortadela de tilápia contendo caseína**. 2019. 44 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2019.

VIVIAN, P. G. *et al.* Atividade antibacteriana de óleos essenciais de *Origanum vulgare* (orégano) e *Ocimum basilicum* (manjeriço) e sua aplicação em massa para embutido cárneo. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v. 6, n. 8, p. 62143-62156, ago. 2020. Disponível em: <https://www.brazilianjournals.com/index.php/BRJD/article/view/15612>. Acesso em: 20 jul. 2021.

WEI, J.-N. *et al.* Phytochemical and bioactive profile of *Coriandrum sativum* L. **Food Chemistry**, [Oxford], v. 286, p. 260-267, July 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30827604/>. Acesso em: 29 jun. 2021.

ZHANG, G.; HOLLEY, R. A. Development and PFGE monitoring of dominance among spoilage lactic acid bacteria from cured meats. **Food Microbiology**, [London], v. 16, n. 6, p. 633-644, 1999. Disponível em: <https://www.semanticscholar.org/paper/Development-and-PFGE-monitoring-of-dominance-among-Guopeng-Holley/7933c208842e115b25a45996d68f790c3f96705e>. Acesso em: 30 jun. 2020.

ZANUTTO, L. D. **Avaliação da textura de embutidos cárneos cozidos tipo mortadela elaborados com filé, carne mecanicamente separada de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e carragena**. 2017. 31 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2017.

APÊNDICE A – Quadros das Análises de Variância (ANOVA)

TABELA 1A - Análise de variância da inibição de *Listeria monocytogenes* pela mistura de óleos essenciais e do tratamento controle em embutido cozido e curado de peixe ao longo de 12 dias, refrigerados a (10°C).

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Amostras	1	0.130929	0.130929	3.524	0.0899
Tempo	4	4.693432	1.173358	31.583	0.0000
Amostras*Tempo	4	0.081420	0.020355	0.548	0.7050
erro	10	0.371513	0.037151		
<hr style="border-top: 1px dashed black;"/>					
Total corrigido	19	5.277293			
<hr style="border-top: 1px dashed black;"/>					
CV (%) =	2.43				
Média geral:	7.9166500	Número de observações:	20		

TABELA 2A - Análise de variância da inibição de Bactérias lácticas pela mistura de óleos essenciais e do tratamento controle em embutido cozido e curado de peixe ao longo de 12 dias, refrigerados a (10°C).

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Amostras	1	0.034911	0.034911	1.415	0.2617
Tempo	4	19.965254	4.991314	202.263	0.0000
Amostras*Tempo	4	0.141196	0.035299	1.430	0.2936
erro	10	0.246773	0.024677		
<hr style="border-top: 1px dashed black;"/>					
Total corrigido	19	20.388135			
<hr style="border-top: 1px dashed black;"/>					
CV (%) =	2.24				
Média geral:	7.0031600	Número de observações:	20		

TABELA 3A - Análise de variância da Atividade de água dos embutidos cozidos e curado de peixe com adição ou não das misturas de óleos essenciais ao longo de 12 dias, refrigerados a (10°C).

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	1	0.000163	0.000163	3.563	0.0617
DIA	4	0.000070	0.000018	0.382	0.8213
TRAT*DIA	4	0.000153	0.000038	0.836	0.5050
BLOCO	1	0.000003	0.000003	0.073	0.7879
erro	109	0.004997	0.000046		
<hr style="border-top: 1px dashed black;"/>					
Total corrigido	119	0.005387			
<hr style="border-top: 1px dashed black;"/>					
CV (%) =	0.69				
Média geral:	0.9863333	Número de observações:	120		

TABELA 4A - Análise de variância do pH dos embutidos cozidos e curado de peixe com adição ou não das misturas de óleos essenciais ao longo de 12 dias, refrigerados a (10°C).

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	1	0.100341	0.100341	5.335	0.0228
DIA	4	5.306703	1.326676	70.544	0.0000
TRAT*DIA	4	0.188280	0.047070	2.503	0.0465
BLOCO	1	0.011021	0.011021	0.586	0.4456
erro	109	2.049888	0.018806		
Total corrigido	119	7.656232			
CV (%) =	2.18				
Média geral:	6.2967500	Número de observações:	120		

TABELA 5A - Análise de variância do Nitrito residual (No₂) dos embutidos cozidos e curado de peixe com adição ou não das misturas de óleos essenciais ao longo de 12 dias, refrigerados a (10°C).

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	1	2005.654567	2005.654567	500.418	0.0000
DIA	4	22398.658387	5599.664597	1397.136	0.0000
TRAT*DIA	4	315.475053	78.868763	19.678	0.0000
BLOCO	1	6.352601	6.352601	1.585	0.2107
erro	109	436.867491	4.007959		
Total corrigido	119	25163.008099			
CV (%) =	3.31				
Média geral:	60.4074167	Número de observações:	120		

TABELA 6A - Análise de variância da oxidação lipídica dos embutidos cozidos e curado de peixe com adição ou não das misturas de óleos essenciais ao longo de 12 dias, refrigerados a (10°C).

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	1	0.136013	0.136013	103.472	0.0000
DIA	4	1.102458	0.275615	209.673	0.0000
TRAT*DIA	4	0.049628	0.012407	9.439	0.0000
BLOCO	1	0.005070	0.005070	3.857	0.0521
erro	109	0.143280	0.001314		
Total corrigido	119	1.436450			
CV (%) =	4.38				
Média geral:	0.8275000	Número de observações:	120		

TABELA 7A - Análise de variância da Luminosidade (L*) dos embutidos cozidos e curado de peixe com adição ou não das misturas de óleos essenciais ao longo de 12 dias, refrigerados a (10°C).

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	1	114.856333	114.856333	10.598	0.0015
DIA	4	725.012167	181.253042	16.724	0.0000
TRAT*DIA	4	17.092833	4.273208	0.394	0.8124
BLOCO	1	124.440333	124.440333	11.482	0.0010
erro	109	1181.346333	10.838040		
Total corrigido	119	2162.748000			
CV (%) =	5.61				
Média geral:	58.6900000	Número de observações:	120		

TABELA 8A - Análise de variância do Ângulo de tonalidade (H*) dos embutidos cozidos e curado de peixe com adição ou não das misturas de óleos essenciais ao longo de 12 dias, refrigerados a (10°C).

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	1	612.008333	612.008333	13.238	0.0004
DIA	4	427.148667	106.787167	2.310	0.0624
TRAT*DIA	4	239.616667	59.904167	1.296	0.2762
BLOCO	1	0.096333	0.096333	0.002	0.9637
erro	109	5039.028667	46.229621		
Total corrigido	119	6317.898667			
CV (%) =	11.13				
Média geral:	61.0633333	Número de observações:	120		

TABELA 9A - Análise de variância do índice de saturação (C*) dos embutidos cozidos e curado de peixe com adição ou não das misturas de óleos essenciais ao longo de 12 dias, refrigerados a (10°C).

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	1	5.940750	5.940750	19.844	0.0000
DIA	4	14.171167	3.542792	11.834	0.0000
TRAT*DIA	4	2.700500	0.675125	2.255	0.0678
BLOCO	1	0.468750	0.468750	1.566	0.2135
erro	109	32.632083	0.299377		
Total corrigido	119	55.913250			
CV (%) =	6.88				
Média geral:	7.9575000	Número de observações:	120		